

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Dora Vuković

UTJECAJ EKSTRAKTA LISTOVA OBIČNE PLANIKE (*ARBUTUS UNEDO* L.) NA DNA
I AKTIVNOST ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U BUBREGU, JETRI I MOZGU
ŠTAKORA SOJA LEWIS

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a dijelom u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicnu rada, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Benković, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Vesni Benković na stručnoj pomoći, utrošenom vremenu, trudu i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima Vlasti i Srećku, baki Anici, bratu Franu i sestri Klari na ogromnoj podršci tijekom svih godina školovanja.

Hvala svim mojim prijateljima i prijateljicama što su uvijek bili tu za mene, poslušali me i uputili riječi motivacije i ohrabrenja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj ekstrakta listova obične planike (*Arbutus unedo* L.) na DNA i aktivnost
antioksidativnih enzima u bubregu, jetri i mozgu štakora soja Lewis

Dora Vuković
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Obična planika (*Arbutus unedo* L.) je mediteranska biljka koja se već stoljećima koristi u narodnoj medicini. Listovi obične planike sadrže visoki udio fenolnih spojeva koji djeluju antioksidacijski, antikancerogeno, antimutageno i protuupalno. Fenolni spojevi u biljkama potiču aktivnost antioksidativnih enzima važnih za borbu s reaktivnim metabolitima kisika čije povišene koncentracije mogu oštetiti stanicu i dovesti do pojave raznih bolesti. Cilj ovog istraživanja je utvrditi učinak ekstrakta listova obične planike na: aktivnost antioksidativnih enzima (SOD i katalaza); lipidnu peroksidaciju te primarna oštećenja DNA u stanicama mozga, jetre i bubrega štakora soja Lewis oba spola. Pokusne skupine tretirane su vodenim ekstraktom lista obične planike (200 mg/kg) per oralno tijekom 28 dana. Utvrđeno je smanjenje aktivnosti katalaze i blago smanjenje aktivnosti superoksid dismutaze u stanicama bubrega štakora oba spola. Tretman nije statistički značajno utjecao na aktivnost katalaze i superoksid dismutaze, kao ni na stupanj lipidne peroksidacije u jetri štakora oba spola. U stanicama mozga ženki zabilježena je statistički značajno povišena vrijednost aktivnosti superoksid dismutaze. U mužjaka štakora došlo je do statistički značajnog povećanja stupnja lipidne peroksidacije u mozgu. Potencijalni genotoksični učinak vodenog ekstrakta listova obične planike određen je komet testom u alkalnim uvjetima. Rezultati ukazuju na oštećenje DNA u stanicama jetre mužjaka i ženki, te vrlo blago oštećenje DNA u stanicama bubrega mužjaka. Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se odredila najprikladnija doza i trajanje tretmana običnom planikom koji će imati najbolji terapijski učinak bez štetnih nuspojava.

(67 stranica, 26 slika, 4 tablice, 175 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: obična planika, fenolni spojevi, arbutin, hidrokinon, katalaza, SOD, MDA

Voditelj: dr. sc. Vesna Benković, izvanredni profesor

Ocjenitelji: dr. sc. Vesna Benković, izvanredni profesor

dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izvanredni profesor

dr. sc. Perica Mustafić, izvanredni profesor

Rad prihvaćen: 08.01.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

Influence of wild strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf extract on DNA and activity of
antioxidative enzymes in Lewis rat kidney, liver and brain

Dora Vuković
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) is a Mediterranean plant which is used for centuries in folk medicine. The leaves contain high concentration of the phenols which have antioxidational, anticancerogenic, antimutagenic and antiinflammatory effects. Phenols can stimulate the activity of antioxidant enzymes important for the endogenous fight with ROS, whose elevated concentrations can damage the cell and lead to various diseases. The aim of this study is to determine the antioxidant activity of Strawberry tree leaf aqueous extracts on: activity of antioxidant enzymes (SOD and catalase); lipid peroxidation and primary DNA damage in brain, liver and kidney cells of the Lewis rats breed of both sexes. Test groups of animals were treated with the aqueous extract of a strawberry tree leaf (200 mg / kg) per orally for 28 days. Reduction of catalase activity and a slight reduction of superoxide dismutase activity in rat kidney cells of both sexes were found. The treatment did not significantly affect the activity of catalase and superoxide dismutase, as well as the level of lipid peroxidation in the rat liver cells of both sexes. In the brain cells of the female rats, statistically significant increase of the catalase activity was observed. In brain cells of male rats statistically significant increased level of lipid peroxidation was recorded. Potential genotoxic effect of the aqueous leaf extract of strawberry tree is determined by using a comet assay in alkali conditions. Results indicate that there is DNA damage in the liver cells of male and female rats, very low DNA damage in the kidney cells of the males rats. Further studies are needed to determine the most appropriate dose and duration of treatment that will have the best therapeutic effect without adverse side effects.

(67 pages, 26 figures, 4 tables, 175 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Keywords: Strawberry tree, phenolic compounds, arbutin, hidroquinone, catalase, SOD, MDA

Supervisor: dr. sc. Vesna Benković, PhD, Professor

Reviewers: dr. sc. Vesna Benković, PhD, Professor

dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, PhD, Professor

dr. sc. Perica Mustafić, PhD, Professor

Thesis accepted: 08.01.2018.

Popis kratica

ALS - alkalno labilna mjesta (od engl. *alkali labile sites*)

DSB - dvolančani lom (od engl. *double-strand break*)

HNE - 4-hidroksinonenal

LDL - lipoprotein niske gustoće (od engl. *low-density lipoprotein*)

LMP - tvar niskog tališta (od engl. *low melting point*)

MDA - malondialdehid

NMP - tvar normalnog tališta (od engl. *normal melting point*)

OECD - Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (od engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*)

PUFA - višestruko nezasićena masna kiselina (od engl. *polyunsaturated fatty acid*)

ROS - reaktivne kisikove jedinke (od egl. *reactive oxygen species*)

SOD - superoksid dismutaza

SSB - jednolančani lom (od engl. *single-strand break*)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Obična planika (<i>Arbutus unedo</i> L.).....	1
1.2. Kemijski sastav listova obične planike	4
1.2.1. Fenolni spojevi.....	4
1.3. Utjecaj ekstrakta lista obične planike na zdravlje.....	11
1.4. Oksidativni stres	14
1.4.1. Stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki	14
1.4.2. Antioksidativna obrana stanica	14
1.4.3. Učinak oksidativnog stresa na membrane stanica i DNA	16
1.5. Određivanje genotoksičnosti komet testom	19
1.6. Cilj istraživanja	20
2. MATERIJALI I METODE	20
2.1. Vodeni ekstrakt listova obične planike	20
2.2. Pokusne životinje	20
2.3. Obrada životinja	21
2.4. Komet test	22
2.5. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentracije MDA u bubregu, jetri i mozgu štakora	24
2.5.1. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry-u	24
2.5.2. Određivanje aktivnosti katalaze	25
2.5.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	26
2.5.4. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije	27
2.6. Statističke metode.....	28
3. REZULTATI	29
3.1. Učinak vodenog ekstrakta listova obične planike na DNA	29
3.1.1. Učinak vodenog ekstrakta listova obične planike na DNA u stanicama bubrega štakora	29
3.1.2. Učinak vodenog ekstrakta listova obične planike na DNA u stanicama jetre štakora ..	31
3.1.3. Učinak vodenog ekstrakta listova obične planike na DNA u stanicama mozga štakora ..	33
3.2. Aktivnost antioksidativnih enzima i stupanj lipidne peroksidacije	36
3.2.1. Aktivnost katalaze u stanicama bubrega štakora	36
3.2.2. Aktivnost katalaze u stanicama jetre štakora.....	37
3.2.3. Aktivnosti katalaze u stanicama mozga štakora.....	37
3.2.4. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD-a) u stanicama bubrega štakora.....	38
3.2.5. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD-a) u stanicama jetre štakora	39
3.2.6. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD-a) u stanicama mozga štakora	40
3.2.7. Koncentracija malondialdehida (MDA) u stanicama bubrega štakora.....	41
3.2.8. Koncentracija malondialdehida (MDA) u stanicama jetre štakora	42
3.2.9. Koncentracija malondialdehida (MDA) u stanicama mozga štakora	43
4. RASPRAVA	45
5. ZAKLJUČAK	50
6. LITERATURA.....	51

7. ŽIVOTOPIS	61
--------------------	----

1. UVOD

Obična planika (*Arbutus unedo* L.) zimzeleni je grm koji pripada porodici vrijesova (*Ericaceae*). U Hrvatskoj je obična planika rasprostranjena dužinom cijele jadranske obale te na otocima: Mljetu, Korčuli, Braču i Lokrumu. Razvija se u obliku makije i niske šume (Torres i sur. 2002; Topić i sur., 2009).

Obična planika se već dugo koristi u narodnoj medicini zbog raznih ljekovitih svojstava koje imaju svi dijelovi ove biljke (listovi, plodovi, korijenje i kora). Liječi gastrointestinalne i urološke probleme, hipertenziju, kardiovaskularne bolesti, dijabetes te ima antiupalno i antimikrobno djelovanje. Ima snažnu antioksidativnu aktivnost. Spojevi koji su povezani s navedenim ljekovitim svojstvima su: fenolni spojevi, karotenoidi i vitamini (C i E). Ostale biološki aktivne komponente u običnoj planici su organske kiseline i terpenoidi (Oliveira i sur., 2011).

1.1. Obična planika (*Arbutus unedo* L.)

Obična planika biljna je vrsta koja pripada porodici *Ericaceae* i potporodici *Vaccinioideae* (prema nekim autorima *Arbutoidae*) (Torres i sur., 2002). U Hrvatskoj je obična planika poznata i pod imenom maginja (Topić i sur., 2009). Latinsko ime „unedo“ znači „pojedi samo jedan“, što nam govori da plod nije ukusan ili da je toliko ukusan da osoba treba pojesti samo jedan (Malheiro i sur., 2012; Trichopoulou i sur., 2000). Prema drugim autorima, naziv potječe od činjenice da konzumacija zrelih plodova može izazvati stanje slično pijanstvu, koje je uzrokovano fermentacijom šećera u zrelih plodovima (Molina i sur., 2011).

Osim na hrvatskoj obali i otocima, obična planika raste i u zapadnoj, središnjoj i južnoj Europi, sjeverno-istočnoj Africi, Kanarskim otocima i zapadnoj Aziji. U Europi obična planika raste u Portugalu, Španjolskoj, Francuskoj, Italiji, Albaniji, Grčkoj, Bosni i Hercegovini, Hrvatskoj, Makedoniji, Crnoj Gori, Srbiji, Sloveniji i na mediteranskim otocima (Balearskim otocima, Korzici, Sardiniji i Kreti). Prilagođena je uvjetima gdje led i snijeg nisu uobičajeni, a ljetna suša nije intenzivna. Obična planika sposobna je prilagoditi se i uvjetima jugo-zapadne obale Irske (Slika 1) (Kim, 2012; Oliveira i sur., 2011; Torres i sur., 2002).



Slika 1. Rasprostranjenost obične planike (*Arbutus unedo* L.) u Europi (preuzeto od: Oliveira i sur., 2011).

U Hrvatskoj, na jadranskoj obali i navedenim otocima obična planika raste s hrastom crnikom (*Quercus ilex* L.), zelenikom (*Phillyrea latifolia* L.) i velikim vrijesom (*Erica arborea* L.) te čini vazdazelenu šumsku vegetaciju. Raste u obliku makije i niske šume (Topić i sur., 2009). Obična planika raste od razine mora do 600 metara iznad razine mora. Staništa obične planike su većinom kameni nagibi, iako može rasti i na suhim ili glinenim tlima (Vidrih i sur., 2013).

Obična planika može rasti 9-12 metara u visinu, ali najčešće raste 1,5-3 metra. Kora ove biljke je ispucala i ljušti se u uzdužnim ljuskama. Listovi su jednostavni, oblanceolatni, naizmjenično postavljeni, tamno smeđi i kožasti. Najčešće imaju rubove nazubljene 2 do 3 puta i nalaze se na peteljkama dužine do 10 milimetara (Slika 2) (Maleš i sur., 2006; Gomes, 2011).

Cvjetovi obične planike zvonolikog su oblika, blijedo ružičasti ili bijeli te tvore viseće grozdaste cvatove. Dugi su oko 8 do 9 milimetara (Slika 2) (Maleš i sur., 2006).

Plodovi su narančasto crvene boje i sazrijevaju u jesen. Okrugle bobice su prekrivene dlakama sličnim bodljicama, sadrže sočnu mekanu žutu pulpu i najčešće su dijametra do 2 centimetra. Plodovi su jestivi, ali imaju ugodan okus samo ako se konzumiraju blago prezreli kada im padne razina tanina i poraste razina šećera (Alarcão-E-Silva i sur., 2001). Ipak, najčešće

se konzumiraju prerađeni kao pekmez, marmelada, liker i rakija (Fonseca i sur. 2015; Miguel i sur. 2014; Rosavec i sur., 2005).



Slika 2. Cvat i plod obične planike

(https://www.naturamediterraneo.com/forum/topic.asp?TOPIC_ID=99517)

Proizvodnja džemova i tekućih pripravaka koji se pripremaju od obične planike predstavljaju veliku ekonomsku važnost ove biljke u ruralnim područjima (Alarcão-E-Silva i sur., 2001). Na Sardiniji i Korzici se od plodova obične planike proizvodi vino i brendi. U Portugalu, plodovi obične planike koriste se za proizvodnju tekućine za piće „aguardente“ što je jedan od primjera kako se plodovi i sjeme vrsta iz nepoznatih izvora vode prema domestikaciji (Gomes i sur., 2016). Još jedna od ekonomskih važnosti obične planike je to da je obična planika medonosna biljka. Med planike je gorkastog okusa i ima moga ljekovita svojstva (Fonseca i sur., 2015).

Osim velike ekonomske važnosti obična planika primjenjuje se u farmaceutskoj i kemijskoj industriji za proizvodnju lijekova zbog visokog udjela fenolnih kiselina, terpenoida, tanina i vitamina C koji imaju snažno antioksidativno djelovanje (Ribeiro i sur., 2017). U jednom istraživanju od 28 analiziranih biljaka koja imaju snažna antioksidativna svojstva ukupan antioksidacijski kapacitet obične planike pokazao se jednim od najvećih (García-Alonso i sur., 2004).

Sjeme obične planike je vrlo sitno. Obična planika se razmnožava iz prošlogodišnjih izbojaka sjetvom te korijencima i reznicama. Odlikuje se velikom izbojnom snagom te je vrlo prilagodljiva raznim uvjetima kao što su posolica, suša i studen. Iz navedenih razloga, ova biljka je pogodna za upotrebu u hortikulturne svrhe u blizini mora (Rosavec i sur., 2005).

S ekološkog gledišta, obična planika je vrlo korisna jer sprječava eroziju tla, posjeduje sposobnost da se brzo obnovi nakon požara i preživljava vrlo dobro u slabo obogaćenim tlima (Takrouni i sur., 2012; Gomes i Canhoto; 2009). Najbolje raste na silikatnim i dekarbonatnim tlima, no može rasti na alkalnim i relativno kiselim tlima (pH 5-7,2) (Torres i sur., 2002; Celikel i sur., 2008; Gomes, 2011; Godinho-Ferreira i sur., 2005).

Osim ljekovitih svojstava, hortikulturne svrhe, ekološke i ekonomske važnosti, obična planika ima i veliku ornamentalnu važnost. U jesen nosi listove i plodove u isto vrijeme te je izrazito lijepa (Slika 2). Razlog tome je što je plodovima obične planike potrebno 12 mjeseci da sazriju (Miguel i sur., 2014; Rosavec i sur., 2005).

1.2. Kemijski sastav listova obične planike

1.2.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi sadrže jedan ili više aromatskih prstenova na kojima se nalaze jedna ili više hidroksilnih skupina. Poznato je oko 8000 fenolnih spojeva koji su široko rasprostranjeni u carstvu biljaka (Strack, 1997). Fenoli su molekule male molekularne mase s jednim aromatskim prstenom ali i kompleksni tanini i derivirani polifenoli. Osnovna podjela fenolnih spojeva prema njihovoj strukturi je na flavonoide i fenolne kiseline (ne-flavonoide). Nadalje, mogu biti klasificirani na osnovi broja ugljikovih atoma, a često se mogu pronaći konjugirani u šećere i organske kiseline (Crozier, 2006).

Fenolni spojevi u biljkama su sekundarni metaboliti i nalaze se u svim biljnim tkivima. Imaju zaštitnu ulogu protiv herbivora i mikrobnih infekcija, djeluju kao alelopatski agensi i štite od UV zračenja. Biljke stvaraju sekundarne metabolite kao obrambeni mehanizam na stresne uvijete u okolišu (npr. izrazito visoke ili izrazito niske temperature). Sekundarni metaboliti mogu se koristiti za proizvodnju boja, vlakana, ljepila, ulja, voskova, kao dodaci okusa, lijekovi

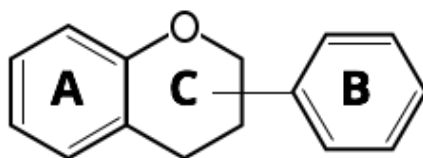
i parfemi a osim toga potencijalan su izvor novih prirodnih lijekova, antibiotika, insekticida i herbicida (Croteau i sur., 2000; Dewick, 2002; Jurica i sur., 2015).

Rezultati novijih istraživanja ukazuju na to da dugotrajna upotreba sekundarnih metabolita može imati odličan učinak na smanjenje mogućnosti pojave raka i mnogih drugih kroničnih, ali i kardiovaskularnih bolesti te dijabetesa tipa 2 (Crozier, 2006).

Polifenolni spojevi u biljkama mogu potaknuti aktivnost antioksidativnih enzima (glutation peroksidaza, katalaza, superoksid dismutaza) važnih za borbu s reaktivnim metabolitima kisika (Tsao, 2010). Fenolni spojevi mogu djelovati antioksidacijsko, antikancerogeno, antimutageno i protuupalno. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva povezana je sa strukturom fenolnih sastojaka i ovisi o broju i pozicijama hidroksilnih skupina, njihovoj glikozilaciji ili o ostalim zamjenskim grupama na fenolnom prstenu (Cai i sur., 2006; Heim i sur., 2002; Huang i Ferraro, 1992).

Flavonoidi su najbrojnija skupina fenolnih spojeva pronađeni u biljnom carstvu (Harborne i Williams, 2000). Prisutni su u visokim koncentracijama u epidermisu listova i koži plodova. U biljkama, flavonoidi su uključeni u različite procese kao što je UV zaštita, pigmentacija i rezistencija na bolesti (Koes i sur., 1994; Pierpoint 2000).

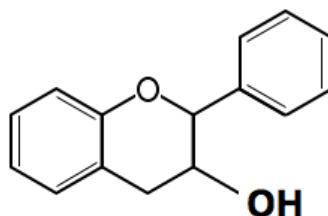
Flavonoidi (C6-C3-C6) su kemijski spojevi u kojima su dva prstena (prsten A i prsten B) fenolne prirode (benzenski prstenovi) vezani na piranski prsten (prsten C) (Slika 3). S obzirom na način hidroksilacije i varijacijama u piranskom prstenu (prsten C) flavonoidi se mogu podjeliti na: antocijanine, flavan-3-ole, flavone, flavanone i flavonole. Većina flavonoida u biljkama postoje kao glikozidi. Biološka aktivnost uključujući i antioksidativnu aktivnost ovih spojeva ovisi o strukturalnim razlikama ovih spojeva, ali i načinu glikozilacije (Tsao, 2010).



Slika 3. Osnovna struktura flavonoida (A i B označavaju dva prstena fenolne prirode koji su vezani na piranski prsten C).

Flavonoidi posjeduju antioksidativnu aktivnost. Zbog prisutnosti hidroksilnih grupa u molekulama flavonoida imaju sposobnost čišćenja slobodnih radikala i kelacije metala (Kumar i Pandey, 2013). Flavonoidi potiču ljudske zaštitne enzimske sustave. Rezultati nekoliko istraživanja ukazuju na zaštitnu ulogu flavonoida protiv mnogih zaraznih bolesti (bakterijskih i virusnih) ali i protiv degenerativnih bolesti kao što su kardiovaskularne, rak i druge bolesti povezane sa starenjem (Cook i Samman 1996; Kumar i Pandey, 2013; Pandey, 2007; Rice-Evans i sur., 1995).

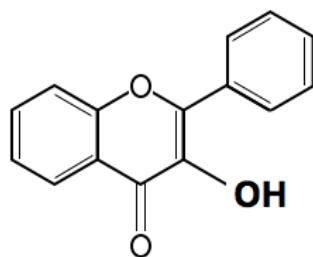
Flavanoli ili flavan-3-oli često se nazivaju i katehini. Za razliku od ostalih flavonoida, nema dvostruke veze između C2 i C3 atoma, i nema C4 karbonilne skupine u prstenu C flavanola (Slika 4).



Slika 4. Osnovna struktura flavanola.

Ovo navedeno svojstvo i hidroksilacija na C3 atomu omogućuje flavanolima da sadrže dva kiralna središta u molekuli (na 2. i 3. ugljikovom atomu) i zbog toga četiri moguća diastereoizomera. Katehin je izomer sa trans konfiguracijom, a epikatehin sa cis konfiguracijom. Svaki od ovih konfiguracija imaju po dva stereoizomera (+)-katehin, (-)-katehin, (+)-epikatehin i (-)-epikatehin (Tsao, 2010). U vodenom i metanolnom ekstraktu lista obične planike detektirani su flavanoli: galokatehin, katehin i katehin-3-galat (Jurica, 2016).

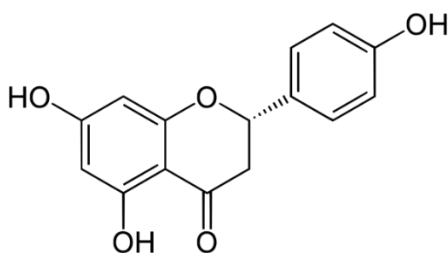
Flavanoli su najčešće prisutni flavonoidi (Crozier, 2006). Najčešći flavanolni aglikoni su kvercetin i kempferol koji imaju barem 279 i 347 različitih glikozidnih kombinacija (Tsao, 2010). Konjugacija se najčešće događa na trećoj poziciji C-prstena ali supstitucija se također događa i na 5, 7, 4, 3 i 5 poziciji ugljičnog prstena (Slika 5) (Crozier, 2006).



Slika 5. Osnovna struktura flavonola.

U vodenom i metanolnom ekstraktu lista obične planike su detektirani flavonoli: miricetin, kvercetin i kamferol. U metanolnom ekstraktu detektiran je i flavonol morin, no on nije detektiran u vodenom ekstraktu. Derivati flavonola detektirani u vodenom i metanolnom ekstraktu listova obične planike su: miricetin 3-*O*-rutinozid, miricetin 3-*O*-heksozid, miricetin-*O*-pentozid izomer 1, miricetin-*O*-pentozid izomer 2, miricitrin (miricetin 3-*O*-ramnozid), kamferol 7-*O*-rutinozid, kvercetin *O*-pentozid izomer 1, kvercetin *O*-pentozid izomer 2, kvercetin derivat, kamferol 3-*O*-pentozid, kvercetin 3-*O* heksuronid, kamferol 7-*O* pentozid, kamferol 7-*O* heksuronid, kamferol 7-*O* ramnozid, kvercetin 3-*O*-*p*-kumaroil heksozid, kamferol 7-*O*-*p* kumaroil heksozid (Jurica, 2016).

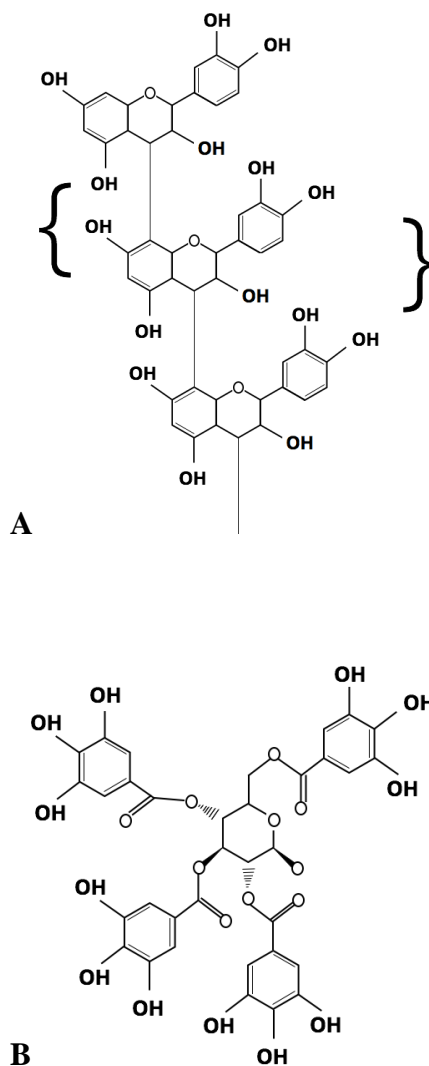
U vodenom i metanolnom ekstraktu detektiran je flavanon naringenin (Jurica, 2016). Naringenin je glikozid koji se u visokim koncentracijama nalazi u citrusnom voću i razlog je njihovim antioksidativnim svojstvima. (Jung i sur., 2003; Renugadevi i Prabu, 2009).



Slika 6. Strukturna formula naringenina.

Tanini su fenolni spojevi velike molekularne mase (500 Da do 3000 Da). U biljkama se nalaze u listovima, stabljici i drvenom dijelu gdje se vežu za proteine i čine netopljive ili topljive komplekse. Biljkama služe kao zaštitni mehanizam protiv herbivora i insekata (Hagerman i Buttler, 1981; Hassanpour i sur., 2011). S obzirom na njihovu kemijsku strukturu i svojstva

dijele se u dvije grupe: hidrolizabilne (galotanini i elagitanini) i kondenzirane tanine (Slika 7). Hidrolizabilni tanini su molekule koje sadrže ugljikohidrate, pretežno D-glukozu kao središnji dio (Min i Hart, 2003). Hidrolizabilni tanini se u biljkama nalaze u nižim koncentracijama nego kondenzirani tanini. Kondenzirani tanini se sastoje od flavonoidne jedinice (flavan-3-ol) koja je povezana sa kemijskom vezom (C-C). Dokazano je da tanini djeluju antimikrobno (Hassanpour i sur., 2011).



Slika 7. Strukturne formule hidrolizabilnih (A) i kondenziranih tanina (B).

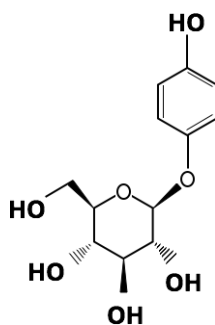
Hidrolizabilni tanini se dijele na taragalotanine (galična i kvinična kiselina) i kafetanine (kafeinska i kvinična kiselina) (Mangan, 1988). Osim povoljnih svojstava tanina, oni mogu imati i štetne učinke. Toksični tanini (više od 20% hidrolizabilnih tanina) mogu uzrokovati različite nepovoljne učinke, što je zapaženo u istraživanjima na ovcama i kozama (Reed, 1995).

Hidrolizabilni tanini mogu preći u pirogalol, spoj koji je toksičan za preživače. Mogu uzrokovati cirozu jetre, oštećenje bubrega, lezije povezane s hemoragičnim gastroenteritisom te visoku smrtnost (Reed, 1995). Hidrolizabilni tanini mogu utjecati i na monogastričare smanjujući stopu rasta, iskorištavanje proteina, uzrokovati oštećenje mukoze probavnog trakta i povećati ekskreciju proteina i aminokiselina (Barry i McNabb, 1999).

Kondenzirani tanini imaju kemijske strukture koje su povezane s njihovim fizikalnim i biološkim svojstvima (Min i sur., 2003). Sastoje se od flavonoidnih jedinica (flavan-3-ol) povezanih sa kemijskom vezom ugljik-ugljik. Tanini pridonose astringentnom okusu listova i plodova (Hassanpour i sur., 2011).

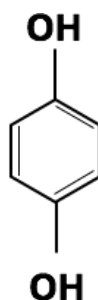
Arbutin (hidrokinon- β -D-glukopyranozid) (Slika 8) fenolni je glukozid kojeg sintetiziraju biljke iz porodice *Ericacea* (Fiorentino i sur., 2007). Jurica (2016) je izvjestio o prisutnosti arbutina te da je arbutin najzastupljeniji fenolni spoj u vodenom i metanolnom ekstraktu listova obične planike.

Već se stoljećima koristi ekstrakt listova biljke *Arctostaphylos uva ursi* (*Ericaceae*) u fitoterapiji za liječenje urinarnih infekcija jer sadrži arbutin. U biljkama, arbutin postoji slobodan ili u esterificiranom obliku (Migas i sur., 2015). Arbutin je sekundarni biljni metabolit koji se formira kao odgovor biljke na infektivne bolesti i stanje stresa (npr. izrazito niske ili izrazito visoke temperature) (Blaut i sur., 2006; Stalikas, 2007). Osim kao antiseptik za liječenje urinarnih infekcija arbutin se koristi i u kozmetičkoj industriji u svrhu izrade preparata za izbjeljivanje kože zbog svojeg inhibitornog efekta na aktivnost tirozinaze (Chisvert i sur., 2010).



Slika 8. Kemijska formula arbutina.

Hidrokinon (4-hidroksifenil- β -glukopiranozid) (Slika 9) je derivat arbutina poznat i pod nazivom β -arbutin. Baktericidna aktivnost pripravaka koji sadrže arbutin pripisuje se hidrokinonu koji se otpušta iz arbutina unesenog u organizam djelovanjem enzima β -glukozidaze (Blaut i sur. 2006, Hildebrand i sur., 1969). Nakon ingestije, arbutin se apsorbira iz probavnog trakta i hidrolizira se pomoću crijevne flore te se formira aglikon hidrokinon (Blaut i sur., 2006, Schindler i sur., 2002).



Slika 9. Kemijska formula hidrokinona.

U biljnim pripravcima koji se koriste za borbu protiv patogenih organizama, hidrokinon je aktivna supstanca koja je u urinarnom traktu ključna za terapijsku aktivnost. Osim povoljnih svojstava, hidrokinon ima hepatotoksičan, nefrotoksičan i genotoksičan potencijal (De Arriba i sur., 2014). Primjena hidrokinona u liječenju ljudskih urinarnih infekcija trebala bi biti kontrolirana kroz sigurnost hrane kao što je monitoring prehrambenog unosa oba spoja (hidrokinona i arbutina). Obična planika sadrži mnoge farmakološki aktivne polifenole ali jedna od njenih glavnih fenolnih komponenti je arbutin (Fiorentino i sur., 2007; Parejo i sur., 2001).

Fenolne kiseline su polifenolne komponente koje se prema svojoj strukturi mogu podijeliti na dva glavna tipa, to su derivati benzojeve i derivati cimetine kiseline (Tsao, 2010). Fenolne kiseline su u prirodi obično prisutne u različitim konjugiranim oblicima ili kao esteri. Fenolne kiseline posjeduju antioksidativnu aktivnost te imaju zaštitnu ulogu protiv oksidativne modifikacije LDL-a (engl. *low-density lipoprotein*) (Sommer i sur., 1997; Trichopoulou i sur., 2005). Unos hrane bogate fenolnim kiselinama može djelovati kao prevencija bolesti srca, moždanog udara i raka (Block i sur., 1992; Huang i Ferraro, 1992; Jacob i Burri, 1996). Kafeinska kiselina, jedna od najistaknutijih derivata cinamične kiseline, može selektivno blokirati biosintezu leukotriena, komponente uključene u imunoregulacijskim bolestima, astme

i alergijskih reakcija (Koshihara i sur., 1984). Fenolne kiseline posjeduju i antibakterijsku aktivnost (Fernandez i sur., 1992).

Fenolne kiseline koje se nalaze u ekstraktu lista obične planike su protokatehinska, klorgenska, p-hidroksibenzojeva, kafeinska, siringinska (3, 5-dimetoksi-4-hidroksibenzojeva kiselina), vanilinska (4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina), p-kumarinska, elaginska, ferulinska (4-hidroksi—3-metoksicinaminska kiselina) i cimetna kiselina (Jurica, 2016).

Derivati fenolnih kiselina prisutni u listu obične planike su hidroksibenzojeva kiselina *O*-heksozid izomer 1, dihidroksibenzojeva kiselina *O*-heksozid, hidroksibenzojeva kiselina kiselina *O*-heksozid izomer 2, kumarinska kiselina *O*-heksozid, elaginska kiselina *O*-heksozid i elaginska kiselina *O*-pentozid (Jurica, 2016).

1.3.Utjecaj ekstrakta lista obične planike na zdravlje

Rezultati mnogih istraživanja upućuju na to da ekstrakt listova obične planike ima snažna antimikrobna svojstva (Bouyahya i sur., 2016; Kivcak i sur., 2001; Orak i sur., 2011). Razlog tome su visoke razine fenolnih spojeva u listovima. Dokazan je antimikrobni učinak prema gram pozitivnim i gram negativnim bakterijama, no različiti načini ekstrakcije pokazali su drugačije rezultate. Uvođenje prirodnih antimikrobnih agenasa kao što je to ekstrakt obične planike mogao bi biti od koristi u sprječavanju kontaminacije do koje može doći prilikom obrade i pripreme hrane u prehrambenoj industriji (Bouyahya i sur., 2016).

Vodeni ekstrakt listova obične planike pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv gram pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, koja je najčešći uzrok trovanja hranom. Dokazan je inhibicijski učinak listova obične planike u različitim otapalima na gram pozitivnu bakteriju *Enterococcus faecalis*. Gram pozitivne bakterije u vanjskoj membrani sadrže peptidoglikan koji nije efikasna propusna zapreka (Kivçak i sur. 2001; Rauha i sur., 2000; Scherrer i Gerhardt, 1971).

Vodeni ekstrakt nije pokazao antimikroban učinak protiv gram negativnih bakterija *Escherichie coli* i *Salmonelle enteritidis* (Scherrer i Gerhardt, 1971). U drugim istraživanjima korišten je metanolni, etanolni, vodeni, acetonski, heksanski i petroleterski ekstrakt lista obične planike prema *E. coli* i također nije bilo antimikrobnog učinka (Dib i sur., 2010, Ferreira i sur.,

2012, Guendoze-Bouchefa i sur., 2015, Kivçak i sur., 2001, Malheiro i sur., 2012). Nije dokazan antimikrobni učinak različitih ekstrakata listova obične planike na gram negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae* (Pavlović i sur., 2014). Otpornost gram negativnih bakterija prema antibakterijskim tvarima mogao bi biti zbog vanjske fosfolipidne membrane koja sadrži lipopolisaharidne sastojke i porine koji se sastoje od selektivne barijere prema hidrofobnim otopljenim tvarima (Nikaido i Vaara, 1985).

Ranije istraživanje na miševima, ukazuje na to da ekstrakt listova obične planike može potisnuti djelovanje transkripcijskog faktora STAT (engl. *Signal Transducers and Activators of Transcription*) koji je jedan od inicijalnih faktora upalnog procesa u upali pluća. Potiskivanje djelovanja navedenog transkripcijskog faktora dovodi do smanjenja svih parametara povezanih s upalom. Prilikom upale dolazi do denaturacije proteina, jedan od njih je albumin. Dokazan je inhibicijski učinak ekstrakta na denaturaciju albumina (Moualek i sur., 2016).

Poznato je da pretjerana aktivacija zgrušavanja može dovesti do raznih kardiovaskularnih bolesti kao što su ateroskleroza, infarkt miokarda i moždani udar. Zbog visokog udjela flavonoida u listovima obične planike, ekstrakt listova obične planike može smanjiti pretjeranu aktivaciju zgrušavanja. Navedena antitrombocitna aktivnost dokazana je na trombocitima štakora koji su inkubirani u uvjetima *in vitro*, a agregacija je potaknuta fiziološkim agensima. Ekstrakt je smanjio stopu zgrušavanja i nije imao toksičan učinak za životinje (El Haouari i Mekhfi, 2017). Osim flavonoida, listovi obične planike sadrže i tanine koji također djeluju antitrombocitno. Ova istraživanja objašnjavaju činjenicu zašto se listovi obične planike već dugo vremena koriste u narodnoj medicini za liječenje hipertenzije (El Haouari i Mekhfi, 2017; Mekhfi i sur. 2004).

Nadalje, ekstrakti listova mogu se primijeniti i za prevenciju upalnih i kardiovaskularnih bolesti jer imaju sposobnost smanjiti mobilizaciju Ca^{2+} iona, smanjuju proizvodnju reaktivnih kisikovih jedinki i tirozin kinaznu fosforilaciju (Mekhfi i sur. 2004). U istraživanju na Wistar štakorima potvrđena je vazorelaksacijska aktivnost ekstrakta listova obične planike. Proučavan je utjecaj ekstrakta listova na aortni prsten štakora. Rezultati ukazuju na snažnu vazorelaksacijsku aktivnost ekstrakta listova zbog prisutnosti oligomernih tanina i katehin galata (Legssyer i sur., 2004).

Antioksidansi su spojevi koji preveniraju patološke promjene u živućim stanicama štiteći od oksidacije njenih glavnih konstituenata (proteina, lipida, ugljikohidrata i DNA). Biljni

ekstrakti posjeduju antioksidativnu aktivnost zbog visokog udjela polifenola, a njihova antioksidativna aktivnost pozitivno je povezana s koncentracijom. Istraživanje provedeno na etanolnim i acetonskim ekstraktima listova obične planike ukazuje na visoke udjele fenolnih i flavonoidnih komponenti što dokazuje visoku antioksidativnu aktivnost ekstrakta (Andrade i sur., 2009).

Kao mnoge druge biljke mediteranskog područja obična planika ima razna ljekovita svojstva i stoga su se dugi niz godina svi dijelovi ove biljke koristili u narodnoj medicini za liječenje različitih bolesti (Tablica 1) (Oliveira i sur., 2011).

Tablica 1. Upotreba različitih dijelova obične planike (*Arbutus unedo* L.) u narodnoj medicini (Oliveira i sur., 2011).

Dio biljke	Medicinska upotreba	Literatura
List	Gastrointestinalni poremećaji, urološki problemi, dermatološki problemi, vaskularna primjena, bolesti bubrega, hipertenzija, bolesti srca, dijabetes, antihemoroidna upotreba, diuretik, anti-upalna upotreba, antidijarejalna upotreba	El-Hilaly i sur., 2003; Cornara i sur., 2009; Leonti i sur., 2009; Ziyat i sur., 1997; Kivcak i sur., 2001
Plod	Gastrointestinalni poremećaji, urološki problemi, dermatološki problemi, bolesti bubrega, kardiovaskularna primjena	El-Hilaly i sur., 2003; Cornara i sur., 2009; Leonti i sur., 2009;
Stabljika	Gastrointestinalni poremećaji, urološki problemi, dermatološki problemi, kardiovaskularna primjena	Ziyat i sur., 1997
Korijen	Gastrointestinalni poremećaji, urološki problemi, dermatološki problemi, kardiovaskularna primjena, hipertenzija, bolesti srca, dijabetes, diuretik, antiupalna primjena, antidijarejalna primjena	Mariotto, 2008; Afkir i sur., 2008; Novais i sur., 2004; Kivcak i sur., 2001

1.4.Oksidativni stres

1.4.1. Stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki

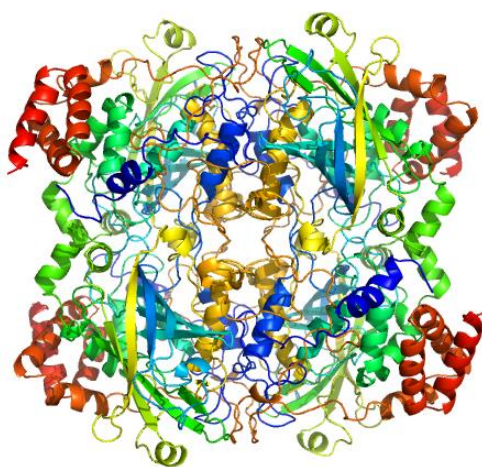
Kao posljedica aerobne respiracije i oksidacije supstrata u aerobnim organizmima dolazi do stvaranja reaktivnih kisikovih jedinki (ROS-engl. *Reactive Oxigene Species*). Slobodni radikali su vrlo reaktivne i nestabilne kemijske čestice jer u vanjskoj ljusci imaju nespareni elektron. Nastaju hemolitičkim cijepanjem kovalentne veze, pri čemu svaki elektron ostaje vezan na po jednom od atoma (Matés i Sánchez-Jiménez, 1999). Hidroksilni radikali ($\bullet\text{OH}$), superoksidni anioni ($\text{O}_2^{\bullet-}$) i vodikov peroksid se stalno proizvode u aerobnim organizmima i prisutni su u njima u malim količinama (Hurst i sur., 1997; Jornot i sur., 1998; Mills i sur. 1998). Njihove niske razine neophodne su u mnogim biokemijskim procesima kao što su unutarstanično signaliziranje prilikom diferencijacije stanica, proliferacije ili za prestanak rasta stanica te apoptoze (Ghosh i Myers, 1998). Sudjeluju u imunom odgovoru organizma na način da stanice koje posjeduju svojstvo fagocitoze (monociti, neutrofili, eozinofili i makrofagi) proizvode reaktivne kisikove jedinice kao dio mehanizma pomoću kojeg mogu uništiti mikroorganizme nakon fagocitoze (Curnutte i Babior, 1987).

Osim kao produkti normalnih metaboličkih procesa, reaktivne kisikove jedinice mogu se stvarati i zbog utjecaja vanjskih čimbenika (izloženost X-zračenju, ozonu, cigaretnom dimu, zagađivačima zraka i industrijskim kemikalijama) (Bagchi i Puri, 1998) te zbog poremećaja u sustavima koji otklanjaju ROS. Takva stanja mogu dovesti do oksidativnog stresa, koji može uzrokovati metaboličke poremećaje i oštećenje bioloških makromolekula (Chopra i Wallace, 1998; Czene i sur., 1997; Wojtaszek, 1997). Nekontrolirana proizvodnja ROS-a igra ulogu u patogenezi mnogih bolesti kao što su ishemija, ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti, rak i alergije (Wiseman i Halliwell, 1996).

1.4.2. Antioksidativna obrana stanica

Povećane razine reaktivnih kisikovih jedinki mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina te oksidirati mnoge organske molekule (McCord, 2000). Antioksidativni enzimi superoksid dismutaza (SOD) i katalaza čine efikasnu obranu protiv oštećenja uzrokovanih ROS-om (Berg i sur., 2013).

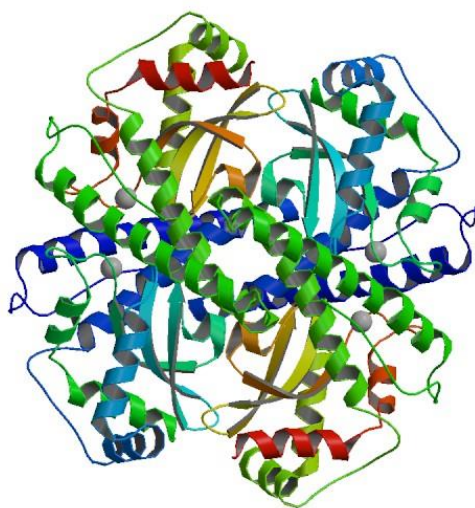
Katalaza (Slika 10) je tetramerni enzim koja se sastoji od četiri identične tetrahedralno uređene jedinice od 60 kD koje sadrže po jednu feriprotoporfirinsku grupu po podjedinici. Katalaza je enzim molekularne masu od oko 240 kD (Aebi, 1980). Reakcijama oksidacije u peroksisomima životinjskih stanica razgrađuju se razni produkti, te može nastati vodikov peroksid koji je štetan za stanicu. U peroksisomima se stoga nalazi enzim katalaza koja vodikov peroksid pretvara u vodu ili pomoću njega oksidira neki drugi organski spoj koji bi također mogao biti štetan za stanicu (Cooper, 2010; Guyton i Hall, 2012)



Slika 10. 3D model humane katalaze.

(https://www.sasbdb.org/media/pdb_file/images/SASDA92_fit1_model1_img.png)

Superoksid dismutaza (Slika 11) je antioksidativni enzim koji katalizira reakciju dismutacije vrlo reaktivnog superoksidnog aniona na kisik i vodikov peroksid koji se zatim uklanja katalazom (Fridovich, 1995; Sandalio i sur., 1997; Teixeira i sur., 1998). Postoji 3 oblika humane superoksid dismutaze. Jedna sadrži mangan i nalazi se u mitohondrijima, druga sadrži bakar i cink te se nalazi se u citoplazmi, a treća se nalazi u izvanstaničnim tekućinama. Svi kataliziraju reakciju dismutacije sličnim mehanizmom (Fridovich, 1997).



Slika 11. 3D model humane superoksid dismutaze.

<https://cdn.rcsb.org/images/rutgers/va/1var/1var.pdb1-500.jpg>

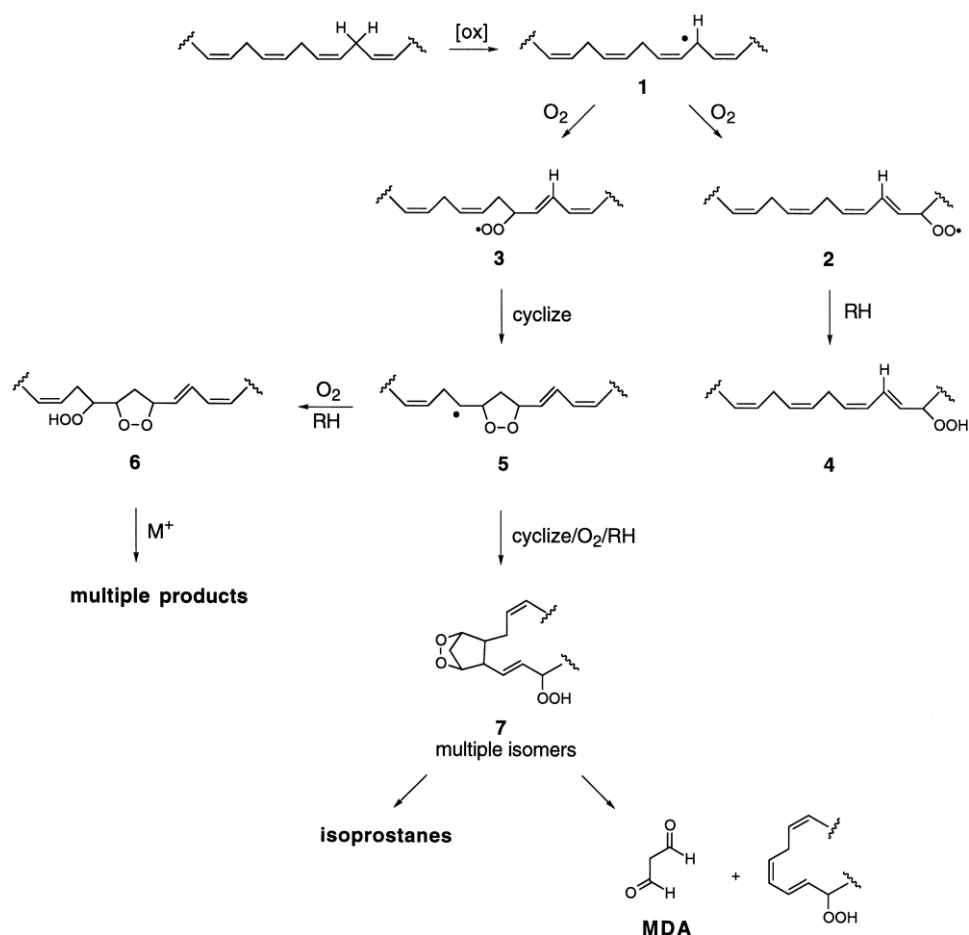
Promjenjene aktivnosti SOD-a mogu dovesti do ishemije, ateroskleroze, Downovog sindroma, Huntingtonove bolesti itd., a promijenjene aktivnosti katalaze i SOD-a mogu dovesti do leukemije, tumora bubrega, jetre, crijeva, dojke i kože (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Za obranu od oksidacijskog oštećenja u stanici služe i antioksidacijski vitamini (E i C). Zbog svoje lipofilnosti vitamin E posebno je koristan za obranu membrana od peroksidacije lipida. Povećani aerobni metabolizam pri vježbanju dovodi do stvaranja više reaktivnih kisikovih jedinki. Kao odgovor, stanica sintetizira više zaštitnih enzima, konačni je rezultat pojačana zaštita jer nakupljena superoksid dismutaza djeluje i za vrijeme stanja mirovanja (Berg i sur., 2013).

1.4.3. Učinak oksidativnog stresa na membrane stanica i DNA

Posljedice oksidativnog stresa mogu biti i narušavanje strukture biomembrana, oštećenje nukleinskih kiselina, inhibicija enzima, razgradnja bjelančevina i lipidna peroksidacija (Slatter i sur., 2000). Lipidna peroksidacija u biološkim membranama može dovesti do gubitka fluidnosti, smanjenja vrijednosti membranskog potencijala, povećanja permeabilnosti prema H^+ ionima, mogućeg oštećenja i otpuštanja sadržaja stanice (Gutteridge, 1993). Povećani stupanj lipidne peroksidacije može za posljedicu imati razvoj mnogih patoloških stanja (Spiteller, 2005).

Zasićene masne kiseline i masne kiseline sa jednom dvostrukom vezom otpornije su na djelovanje ROS-a nego li višestrukonezasićene masne kiseline (PUFA engl. *Polyunsaturated fatty acids*). Iako mnogi radikali mogu potaknuti proces lipidne peroksidacije najčešće ju uzrokuje hidroksilni radikal. Peroksidacija u lipidnim sustavima (Slika 12) odvija se na način da reaktivne kisikove jedinke izdvoje atom vodika iz metilenske skupine (-CH₂-). Tako iz PUFA-e nastaju slobodni lipidni radikali. Superoksidni radikal nije dovoljno reaktivan za eliminaciju vodika no slobodni radikali koji mogu oksidirati PUFA-u su hidroksilni (OH•), hidroperoksilni (HO₂•), alkoksilni (RO•) i peroksilni (RO₂•) radikali. Prisutnost dvostrukih veza u masnim kiselinama oslabljuje veze C-H na atomu ugljika u blizini dvostruke veze, te tako premještanje vodika čini lakše. Kako bi se stabilizirali, u ugljikovim radikalima dolazi do premještanja molekula te se oblikuju konjugirani dieni (Halliwell, 1991).



Slika 12. Putevi peroksidacije u lipidnim sustavima.

(Preuzeto od: Marnett, 1999)

U aerobnim se uvjetima konjugirani dieni mogu spajati s kisikom te stvoriti peroksilne radikale. Peroksilni radikali mogu eliminirati vodik iz PUFA-e ili nekih drugih organskih molekula. Tim procesom nastaju ciklički peroksidi, lipidni hidroperoksidi i reaktivni ugljikovi radikali. Lipidni peroksidi pod djelovanjem iona željeza ili bakra stvaraju toksične razgradne produkte kao što su: aldehidi, ketoni, ugljikovodici, epoksidi i aktivni radikali. (Leonarduzzi i sur., 2005). Jedan od takvih produkata je malondialdehid (MDA) te se on stoga može koristiti u procjeni oksidativnog stresa tijekom različitih patoloških stanja (Slatter i sur., 2000) MDA može nastati i biosintezom prostaglandina (Marnett, 1999)

MDA je mutagen i kancerogen. U fiziološkim uvjetima nalazi se u obliku enolatnog iona koji može reagirati sa proteinima te ima izraziti afinitet prema lizinskom ostatku. Ciljno mjesto napada MDA u molekuli DNA je gvanin, a to može dovesti do mutagenih oštećenja (Leonarduzzi i sur., 2005).

MDA u reakciji sa DNA formira adukte deoksigvanozine i deoksiadenozin. Glavni adukt u DNA je pirimidopurinon i naziva se M1G. M1G u humanoj jetri, bijelim krvnim stanicama, gušterači moguće je detektirati nizom tehnika. M1G je endogeni adukt DNA koji u ljudi može značajno doprinijeti razvoju raka i to najčešće onih povezanih sa životnim stilom i načinom prehrane (Marnett, 1999).

Osim MDA, postoje još neki vrlo toksični produkti lipidne peroksidacije a to su hidroksialkenal 4-hidroksinonenal (HNE) te izoprostani. HNE je produkt peroksidacije omega-6 višestrukonezasićenih masnih kiselina (linoleinske i arahidonske). U većim količinama ima izrazito toksično djelovanje, inhibira stanični rast, sposoban je modificirati lipoproteine, te potaknuti razvoj ateroskleroze (Leonarduzzi i sur., 2005). Hidroksialkenali su reaktivni zbog prisutnosti aldehidne, hidroksilne i dvostruke veze u svojim molekulama. U fiziološkim uvjetima pokazuju afinitet prema amino skupinama u DNA bazama, proteinima (lizinskim ostacima u lipoproteinima lipoproteinima), fosfolipidima (fosfatidil-serin i fosfatidil-etanolamin) ali i pokazuju selektivnost prema -SH skupinama u albuminu (Yang i sur., 1998).

Izoprostani se stvaraju oksidacijom fosfolipida. Izoprostani su izomeri prostaglandina koji nastaju lokalno u staničnoj membrani. Moguće ih je mjeriti u humanoj plazmi i u mokraći te se koriste kao markeri lipidne peroksidacije. Pri povećanim koncentracijama izoprostana u plazmi, može doći do hepatorenalnoga sindroma (Moore, 2004). Stvaranje izoprostana također je odražava oksidacijski stres u aterosklerozi (Patrignani i Tacconelli, 2005).

1.5.Određivanje genotoksičnosti komet testom

Raznim fizikalnim i kemijskim agensima DNA može biti oštećena. Kako bi se navedena oštećenja detektirala, razvijena je metoda komet test ili mikroelektroforeza. Komet test ima široki spektar primjene u: procjeni genotoksičnosti, monitoringu kontaminacije okoliša genotoksičnim tvarima, istraživanjima u molekularnoj epidemiologiji, humanom monitoringu te fundamentalnim istraživanjima oštećenja, ali i popravka DNA (Collins, 2004).

U samom početku primjene ove metode (Ostlin i Johnson, 1984) mikrogel elektroforeza korištena je za detekciju dvolančanih oštećenja DNA na razini pojedinih stanica. Za elektroforezu je korišten pufer neutralne pH vrijednosti. Nešto kasnije, Singh i sur. (1988) koristili su ovu metodu, ali elektroforezu su izvodili u alkalnoj sredini (pH 13). Alkalnim komet testom moguće je detektirati: dvolančane i jednolančane lomove DNA, jednostavne lomove stvorene tijekom ekscizijskog popravka DNA i mjesta koja su osjetljiva na lužine (ALS, *engl. alkali-labile sites*).

Izvođenje komet testa u alkalnim uvjetima povećalo je osjetljivost ove metode, što je vrlo bitno jer genotoksične tvari najčešće i uzrokuju jednolančane, a ne dvolančane lomove.

Naziv metode potječe od izgleda DNA čiji se dio zadržava u jezgri što čini „glavu“ kometa, a dio migrira nadovezujući se na glavu te daje utisak „repa“ kometa. Veličina i oblik te raspodjela DNA unutar kometa ukazuju na tipove oštećenja DNA (Fairbairn i sur., 1995). Komet test može se primijeniti u *in vivo* i *in vitro* uvjetima te je njime moguće detektirati oštećenja DNA bakterija, te biljnih i animalnih stanica (Bajpayee i sur., 2016).

1.6. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je utvrditi djelovanje vodenog ekstrakta listova obične planike na stanicame jetre, bubrega i mozga štakora soja Lewis određivanjem: primarnih oštećenja DNA, aktivnosti antioksidativnih enzima te stupnja lipidne peroksidacije.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Vodeni ekstrakt listova obične planike

Za potrebe istraživanja korišten je unaprijed priređeni liofilizirani vodeni ekstrakt listova obične planike (Jurica, 2016). Ukratko, listovi obične planike su prikupljeni po principu slučajnosti s većeg broja stabala i grmova na otoku Malom Lošinju. Listovi su osušeni u tamnoj prostoriji pri sobnoj temperaturi te čuvani u zatvorenoj tamnoj posudi. Uzorci osušenih listova samljeveni su u prah u laboratorijskom mlinu. Vodeni ekstrakt listova obične planike priređen je otapanjem 3 grama praha u 80 ml vode. Smjesa je inkubirana 60 minuta na 50 °C uz povremeno miješanje (svakih 15 minuta po 20 sekundi). Nakon toga otopina je centrifugirana 15 minuta na 4000 okretaja te profiltrirana kroz gusti filter papir. Supernatant je liofiliziran na -50 °C tijekom 48 sati.

2.2. Pokusne životinje

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su štakori soja Lewis (Slika 13) starosti oko 60 dana. Životinje su uzgojene u uzgajalištu Zavoda za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokus je proveden u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/2006.) i prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN, 55/2013.). Za provođenje pokusa na životinjama ishoda je suglasnost Etičkog povjerenstva (URBROJ: 251-58-10617-14-104).



Slika 13. Štakor soja Lewis.

(<http://www.janvier-labs.com/rodent-research-models-services/research-models/per-species/inbred-rats/product/lewis.html>)

2.3.Obrada životinja

Životinje su slučajnim odabirom raspoređene u skupine od po 4 životinje istoga spola. Tijekom 28 dana dvije su skupine (muški i ženski spol) tretirane vodenim ekstraktom lista obične planike u dozi od 200 mg/kg, a dvije kontrolne skupine tretirane su istim volumenom redestilirane vode. Štakori su tretirani oralno gastralnom kanilom u skladu s odredbom 407 OECD (engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*) i US EPA (engl. *United States Environmental Protection Agency*) prema preporukama o trajanju kratkoročnog toksikološkog tretiranja (OECD 407, 2008). Tijekom tretmana životinje su držane u istim uvjetima, hranjene su standardnom laboratorijskom hranom (Standard Diet GLP, 4 RF 1, Mucedola, Settimo Milanese, Milano, Italija), uz stalno dostupnu vodu *ad libitum*. Žrtvovanje životinja izvršeno je 24 sata nakon primjene zadnje doze radi uzimanja uzoraka organa (bubreg, jetra, mozak). Tijekom tog postupka sve životinje su adekvatno anestezirane i analgezirane intraperitonealnom primjenom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 (Lure Cedex, Francuska) (djelatna tvar ketamin) (0,8 mL/kg) i Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., (Gorzow, R. Poljska) (djelatna tvar ksilazin) (0,6 mL/kg).

2.4.Komet test

U ovom istraživanju primijenjena je standardna izvedba komet testa u alkalnim uvjetima koju su opisali Singh i sur. (1988). Metoda je primijenjena na stanicama bubrega, jetre i mozga štakora soja Lewis.

Komet test izvodi se u nekoliko koraka (Slika 10). Kako bi se izbjegla dodatna oštećenja DNA, svi postupci izrade provedeni su u tamnoj prostoriji uz žuto svjetlo.

Suspenzije stanica (10 μ L) ispitivanih organa pripremljene su mehaničkim usitnjavanjem tkiva bubrega, jetre i mozga u puferu za homogenizaciju [(0,075 M NaCl i 0,024 M Na₂EDTA, pH 7,5] prethodno ohlađenom na 4 °C.

- Priprema preparata

Pripremljene su svježe otopine 1 %-tne i 0,6 %-tne agaroze normalnog tališta (NMP – engl. *Normal Melting Point*) (Sigma), te 0,5 %-tne agaroze niskog tališta (LMP– engl. *Low Melting Point*). Nakon pripreme otopina agaroze, 1 %-tna agarozna nakapavala se na brušeno predmetno stakalce te je pokrivena pokrovnicom te ostavljena da polimerizira na hladnoj podlozi (ledena ploča). Nakon polimerizacije 1 %-tnog gela, gel je uklonjen sa stakalca te je nakapno 500 μ L 0,6 %-tne NMP agaroze, pokriveno pokrovnicom i ostavljeno na hladnoj podlozi 10 minuta. Nakon polimerizacije i skidanja pokrovnica, stavljen je sloj 0,5 %-tne LMP agaroze (100 μ L) pomiješane s 10 μ L uzorka. Nakon 10 minuta polimeriziranja na hladnoj podlozi, sloj je prekriven sa 100 μ L 0,5 %-tne LMP agaroze i opet je držana na ledu 10 minuta.

- Liza staničnih struktura

Nakon polimerizacije skinuta je pokrovnica, a preparati su uronjeni u otopinu za lizu. Pufer za lizu (pH 10) pripremljen je iz matične otopine za lizu [NaCl (Kemika), Na-laurilsarkozinat (Sigma-Aldrich, SAD), Tris-HCl (Sigma-Aldrich)], uz dodatak 10 %-tne otopine DMSO (Kemika) i detergenta Tritona X-100 (Sigma-Aldrich). Preparati su se u puferu za lizu držali dva sata na temperaturi od 4 °C.

- Denaturacija

Nakon lize, preparati su prebačeni u pufer za denaturaciju. Denaturacija za alkalni komet test provedena je u puferu s pH 13 tijekom 20 minuta [NaOH (Kemika) i Na₂EDTA (Sigma-Aldrich)] koji je priređen neposredno prije upotrebe.

- Elektroforeza

Nakon denaturacije, provedena je horizontalna elektroforeza. Elektroforeza za alkalni komet test provedena je u istom puferu kao i denaturacija, pri jakosti struje od 300 mA, naponu od 25 V i trajanju od 20 minuta.

- Neutralizacija i dehidriranje

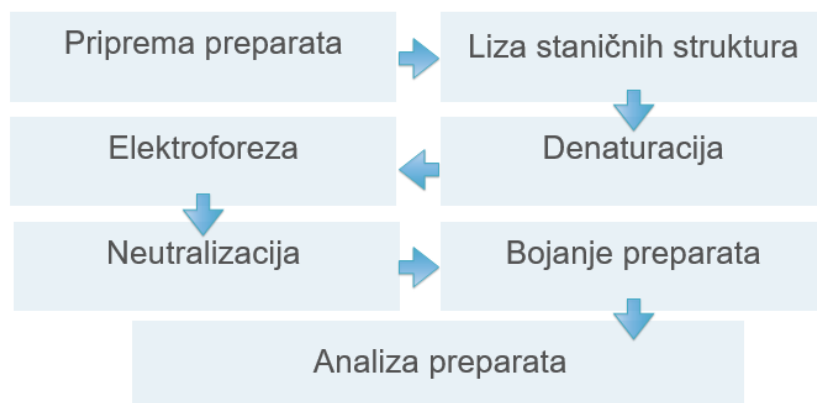
Preparati su isprani tri puta po 5 minuta u neutralizacijskom puferu (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5). Nakon toga preparati su dehidrirani uranjanjem u apsolutni etanolni alkohol (96%) na sedam minuta te osušeni na sobnoj temperaturi. Preparati su pohranjeni na tamnom i hladnom mjestu do analize.

- Bojenje preparata

Preparati su obojani sa 100 µL etidij bromida (20 µg/mL) (Sigma-Aldrich) u trajanju od 10 minuta kako bi mogli biti analizirani.

- Analiza preparata

Analiza preparata provedena je pomoću epifluorescencijskog mikroskopa (Olympus, Japan). Mjerenja su izvršena pomoću programa za analizu slike (Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK). Mjereno je 50 kometa po uzorku (po životinji) odnosno 200 kometa po skupini. Mjereni su parametri dužina repa kometa (izražena u mikrometrima), postotak DNA u repu i repni moment. Navedenim programom moguće je izmjeriti u druge parametre, no u ovom istraživanju analizirana su navedena tri parametra.



Slika 14. Shematski prikaz osnovnih koraka u izvođenju komet testa.

2.5. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentracije

MDA u bubregu, jetri i mozgu štakora

U svrhu određivanja aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentracije MDA izvagane su jednake količine tkiva jetre, bubrega i mozga štakora (30-45 mg). Svaki uzorak tkiva stavljen je u Eppendorf epruvetu od 1,5 ml te je dodan fosfatni pufer za homogenizaciju u omjeru od 1:10 prethodno ohlađen na 4 °C. Uzorci su homogenizirani pomoću ultrazvučne sonde, a tijekom homogenizacije uzoraka uzorci su cijelo vrijeme bili na ledu. Nakon homogenizacije, uzorci su centrifugirali na 15 000 okretaja tijekom 15 minuta na 4°C. Supernatant je odvojen u novu Eppendorf epruvetu te su priređena su razrjeđenja koja su korištena u daljnjoj analizi.

2.5.1. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry-u

Analizom po Lowry-u izmjerene su koncentracije proteina u uzorcima bubrega, jetre (razrjeđenje 40x) i mozga (razrjeđenje 10x) štakora soja Lewis.

Metoda se temelji na biuretskoj reakciji redukcije bakra u reakciji s peptidnom vezom u lužnatim uvjetima. Reducirani monovalentni ion bakra (Cu^+) i ostaci tirozina, triptofana i cisteina iz proteina reagiraju s Folinovim reagensom, pri čemu nastaje nestabilni produkt, koji

se zatim reducira do molibden/volfram plavog ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Reakcija rezultira plavim obojenjem, koje ovisi o sadržaju tirozina i triptofana u uzrocima (Waterborg, 2002).

Korištene otopine:

Otopina A (2 g Na_2CO_3 + 100 ml 0,1M NaOH) 2%

Otopina B (0,1 g NaK-tartarata + 10 ml dH_2O) 1%

Otopina C (0,005 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ + 10 ml dH_2O) 0,5%

Otopina D (otopina A, B i C pomiješane u omjeru 48:1:1)

Otopina E (14 ml Folinovog reagensa + 7 ml dH_2O)

U epruveti je pomiješano 2 mL otopine D sa 100 μl uzorka navedenih koncentracija za određeni organ. Uzorci su inkubirani sljedećih 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, u epruvetu je dodano 200 μl otopine E, uzorci su vorteksirani i zatim inkubirani u tami na sobnoj temperaturi.

Kao standard upotrijebljen je albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA) u različitim koncentracijama (1,5; 1,25; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 i 0 mg/ml). Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentracije BSA određen je nagib pravca preko kojeg je izračunata koncentracija proteina u uzorcima prema formuli:

$$c = ((A \text{ uzorka} - \text{bst. krivulje}) / \text{nagib pravca st. krivulje}) \times \text{razrijeđenje}$$

(gdje je c koncentracija proteina, A je apsorbancija).

Dobivene vrijednosti koncentracija proteina u uzorcima izražena je kao mg/ml te su korištene su za daljnje izračune određivanja aktivnosti antioksidativnih enzima i koncentracije MDA u uzrocima.

2.5.2. Određivanje aktivnosti katalaze

Određivanje aktivnosti katalaze u uzorcima bubrega, jetre i mozga štakora soja Lewis provedeno je pomoću spektrofotometra UV-160 (Shimadzu). Test se temelji na praćenju sniženja apsorbancije reakcijske smjese tijekom 60 sekundi pri 240 nm (UV-područje), nastale kao rezultat enzimske razgradnje vodikova peroksida (H_2O_2), koji pokazuje maksimum apsorbancije pri $\lambda=240 \text{ nm}$.

Za potrebe mjerenja aktivnosti katalaze priređena je 10 mM otopina H_2O_2 koja je priređena miješanjem otopine 99,887 ml PBS-a i 113 μl 30%-tne otopine H_2O_2 .

U kvarcnu kivetu dodano je 20 μl uzorka tkiva organa (određenog razrjeđenja) i 980 μl 10 mM otopine vodikovog peroksida, čime započinje enzimska reakcija. Kiveta je prekrivena parafilmom, promiješana, te je izmjerena apsorbancija. Prije mjerenja razrjeđenje uzorka podešeno je tako da vrijednost apsorbancije bude u intervalu od -0,0025 do 0,0500.

Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta vodikovog peroksida ($\epsilon=39,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), kao μmol razgrađenog vodikovog peroksida po minuti po miligramu proteina ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min mg proteina}$), prema formuli:

$$c = (A \text{ uzorka} / (\epsilon \text{ H}_2\text{O}_2 \times l)) \times \text{razrjeđenje}$$

(gdje je: c-koncentracija, A-apsorbancija, ϵ -ekstinkcijski koeficijent, l-put koji zraka svijetla prođe kroz kivetu (1 cm).

Rezultat je izražen kao jedinice katalaze po miligramu proteina (U CAT/mg proteina).

2.5.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Određivanje aktivnosti SOD-a u stanicama bubrega, jetre i mozga štakora soja Lewis provedeno je pomoću UV spektrofotometra UV-160 (Shimadzu). Metoda se temelji na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza.

Korištene su dvije otopine (A i B). Otopina A pripremljena je miješanjem otopine citokroma c s otopinom ksantina u omjeru 10:1. Otopina citokroma c pripremljena je miješanjem 29 mg citokroma c i 190 ml 50 mM PBS-a sa 0,1 mM EDTA. Otopina ksantina je pripremljena otapanjem 3 mg ksantina u 19,74 ml NaOH. Ksantin je otapan u čaši uz pomoć magnetske miješalice ($t=30-40^\circ\text{C}$). Otopina B pripremljena je miješanjem 100 μl enzima ksantin-oksidade i 2400 μl dH_2O . Kako bi otopina bila zaštićena od utjecaja svijetla, Eppendorf epruveta sa otopinom je tijekom cijelog postupka bila omotana aluminijskom folijom i držana na ledu.

Boca (500 mL) je umotana u aluminijsku foliju te je u nju dodana prethodno pripremljena otopina A. Otopina je pomiješana na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi.

Korištene su dvije slijepe probe. Apsorbancija prve slijepe probe (1,45 ml otopine A) mjerena je na 550 nm tijekom 3 min. Druga slijeпа proba (1,45 ml otopine A + 15-30 ml otopine B + 25 μ L PBS) služi za namještanje enzimske aktivnosti ksantin oksidaze (0,0250 U/min). mijenjanjem volumena otopine B.

Prva slijeпа proba ostaje u spektrofotometru. Uzorak za mjerenje enzimske aktivnosti SOD-a pripremljen je dodavanjem određenog volumena uzorka koji je odgovarao volumenu podešenog enzima, 1,45 ml otopine A i odgovarajući volumen otopine ksantin oksidaze. Kiveta je zatvorena parafilmom. Uzorak je razrijeđen tako da pri odgovarajućoj količini enzima apsorbancija bude u intervalu od 0,0090-00180. Mjerenje je izvršeno pri valnoj duljini od 550 nm.

Aktivnost SOD izražena je kao U/mg proteina, a mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti ksantin oksidaze koja se računa prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - (\Delta A \text{ uzorka} / \Delta A \text{ slijeпа proba}) \times 100$$

(gdje je A apsorbancija).

Enzimska aktivnost SOD računa se prema formuli:

$$\text{aktivnost SOD} = 10^{((\% \text{ inhibicije} + 12,757) / 30,932)}$$

2.5.4. Određivanje stupnja lipidne peroksidacije

Stupanj lipidne peroksidacije određen je mjerenjem koncentracije MDA u stanicama bubrega, jetre i mozga štakora soja Lewis. Korišten je spektrofotometar Libra S22 (Biochrom).

Korištene su četiri otopine (A, B, C i D). Otopina A priređena je otapanjem 0,81 g SDS-a u 10 ml dH₂O. Otopina B priređena je miješanjem 20 ml 99,5% CH₃COOH, 2,31 ml 37% HCl (pH 3,5) i 77,69 ml dH₂O. Otopina C priređena je miješanjem 0,8 g TBA, 40 ml dH₂O, 500 μ l NaOH i 59,5 ml dH₂O. Otopina D priređena je miješanjem 10 mL otopine A, 75 mL otopine B i 75 mL otopine C.

U Eppendorf epruvetu dodano je 100 μ L supernatanta dobivenog homogeniziranjem i centrifugiranjem tkiva te 1,6 ml otopine D. Epruvete su omotane aluminijskom folijom (zajedno

sa stalkom) te inkubirane 60 minuta na 95°C u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije, uzorci su ohlađeni na ledu oko 10 minuta. Nakon hlađenja uzorci su centrifugirani na 5000 rpm/15 minuta pri 4°C. Supernatant je odvojen u kvarcnu kivetu i apsorbancija uzoraka izmjerena je pri valnoj duljini od 523 nm.

Ukupnu koncentracija MDA izražena je kao nmol MDA po mg proteina prema navedenoj formuli:

$$c(\text{MDA}) = A \times V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{ml}) / \varepsilon \times V_{\text{uzorka}} (\text{ml}) \times c_{\text{proteina}} (\text{mg/ml})$$

(gdje je A apsorbancija uzorka, V je volumen, ε je ekstinkcijski koeficijent (0,156 mM⁻¹ cm⁻¹), c je koncentracija proteina).

2.6. Statističke metode

Za obradu rezultata korišten je računalni program STATISTICA 13.1 (StatSoft, Tulsa, SAD). Vrijednosti triju parametara dobivenih komet testom (dužina repa, intenzitet repa i repni moment) obrađene su pomoću klasične deskriptivne statistike u Microsoft Office Excel-u 2010. Parametri su obrađeni primjenom analize varijance (ANOVA) uz post-hoc Scheffe-test kako bi se utvrdila razlika između kontrolnih i skupina tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike. Vrijednosti dobivene UV spektrofotometrijskim metodama (aktivnost katalaze, aktivnost SOD-a te koncentracija MDA) obrađene su pomoću klasične deskriptivne statistike u Microsoft Office Excel-u 2010. Vrijednosti smo izrazili pomoću parametara deskriptivne statistike: srednja vrijednost i standardna pogreška. Statističke značajnosti između grupa utvrđene su t-testom. Prag statističke značajnosti definiran je vrijednostima $p \leq 0,05$.

3. REZULTATI

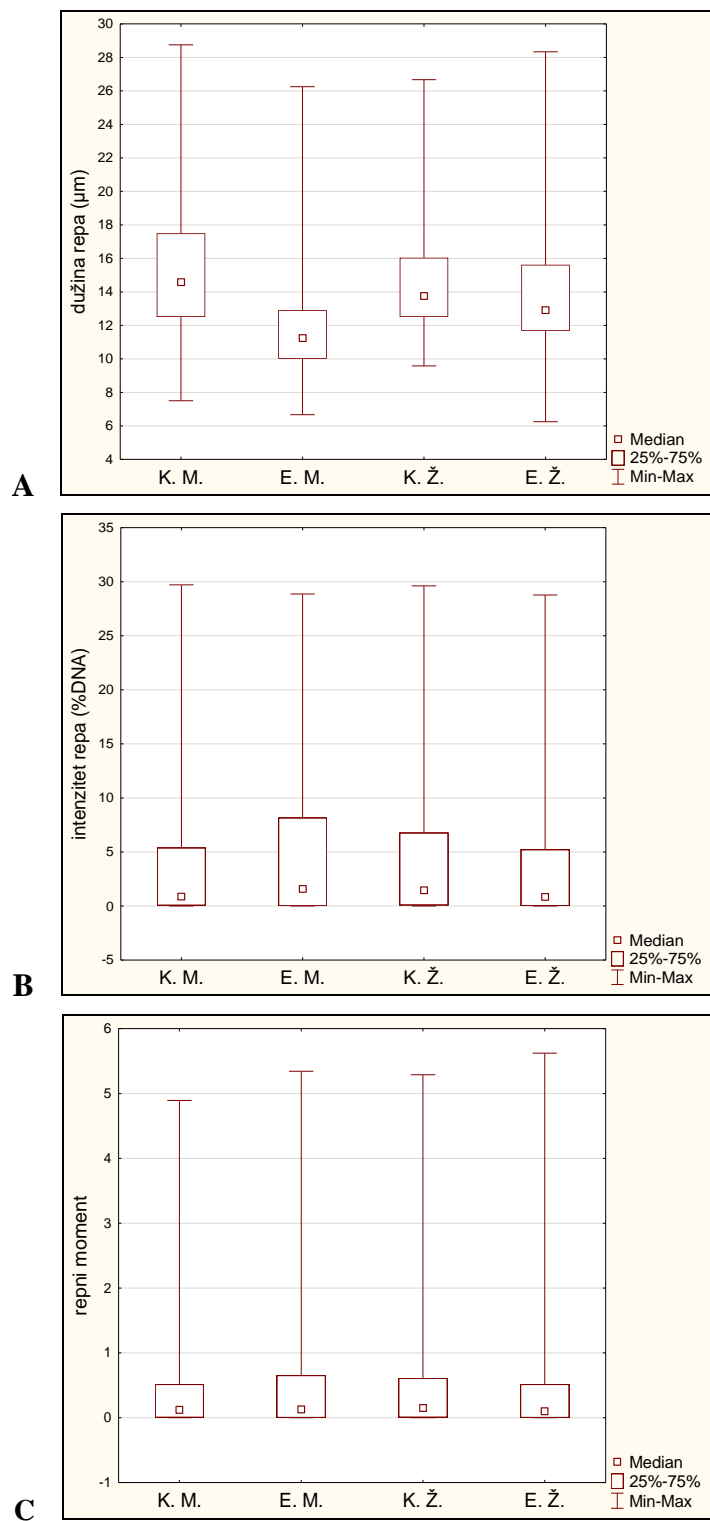
3.1. Učinak vodenog ekstrakta listova obične planike na DNA

U ovom je radu analiziran učinak vodenog ekstrakta listova obične planike na oštećenje DNA u stanicama bubrega, jetre i mozga mužjaka i ženki štakora. Nakon 28-dnevnog tretmana pokusnih životinja, pripremljeni su homogenati stanica bubrega, jetre i mozga tretiranih životinja te su oštećenja DNA izmjerena primjenom komet testa u alkalnim uvjetima. Rezultati mjerenja prikazani su parametrima: dužina repa, intenzitet repa i repni moment. Sva tri parametra analizirani su klasičnom deskriptivnom statistikom te izražena su kao srednja vrijednost sa standardnom pogreškom, medijan, minimum i maksimum. Analizom varijance uz primjenu *post-hoc* Scheffé-ovog testa ispitana je statistička značajnost ($p < 0,05$) za sva tri navedena parametra.

3.1.1. Učinak vodenog ekstrakta listova obične planike na DNA u stanicama bubrega štakora

U stanicama bubrega mužjaka štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike uočena je statistički značajno niža vrijednost parametra dužina repa ($12,03 \pm 0,24$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($15,75 \pm 0,31$) (Slika 15A, Tablica 2). Nasuprot tome vrijednost parametra intenzitet repa u stanicama bubrega mužjaka štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike ($5,21 \pm 0,50$) povećane su u odnosu na kontrolnu skupinu ($4,16 \pm 0,43$) (Slika 15B, Tablica 2). Snižena vrijednost je uočena i u parametru repni moment ($0,43 \pm 0,05$ tretman: $0,48 \pm 0,06$ kontrola) (Slika 15C, Tablica 2).

U stanicama bubrega ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike uočena je niža vrijednost parametra dužina repa i intenzitet repa ($13,92 \pm 0,28$ i $3,80 \pm 0,42$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($14,78 \pm 0,26$ i $4,58 \pm 0,45$) (Slika 15A i B, Tablica 2). Nasuprot toga vrijednost repnog momenta u tretiranoj skupini ($0,51 \pm 0,07$) povećana je u odnosu na kontrolnu skupinu ($0,45 \pm 0,05$) (Slika 15C, Tablica 2).



Slika 15. Dužina repa (A), intenzitet repa (B) i repni moment (C) izmjereni komet testom u stanicama bubrega mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

K.M. – kontrolna skupina mužjaka štakora; K.Ž. – kontrolna skupina ženki štakora; E. M. – skupina mužjaka štakora tretirana vodenim ekstraktom listova obične planike; E.Ž. – skupina ženki štakora tretirana vodenim ekstraktom listova obične planike

Tablica 2. Statističke značajnosti parametara: dužina repa, intenzitet repa i repni moment izmjerene komet testom u stanicama bubrega mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana (analiza varijance uz post-hoc Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

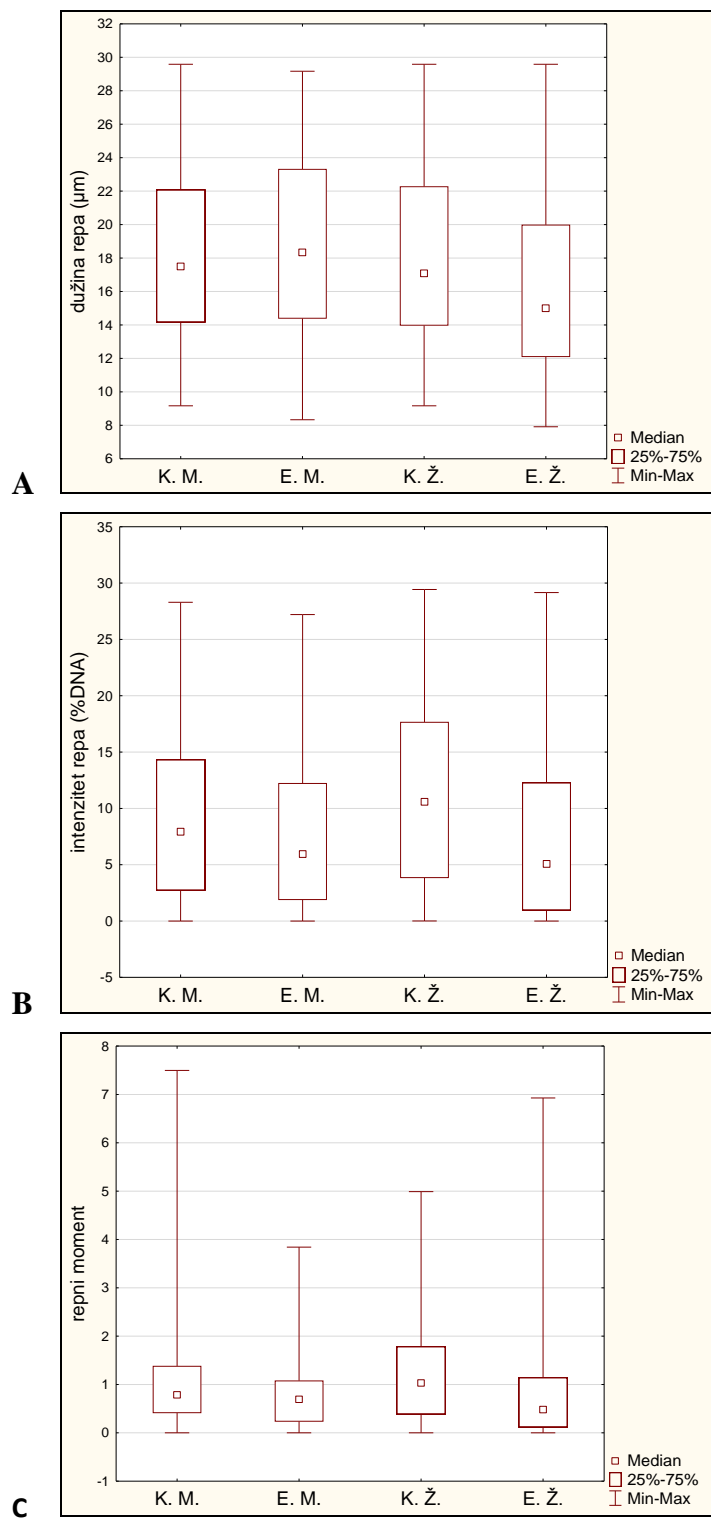
	Dužina repa			
	Kontrola ♂	Ekstrakt ♂	Kontrola ♀	Ekstrakt ♀
Kontrola ♂		0,000000	n.z.	0,000020
Ekstrakt ♂	0,000000		0,000000	0,000001
Kontrola ♀	n.z.	0,000000		n.z.
Ekstrakt ♀	0,000020	0,000001	n.z.	
	Intenzitet repa (% DNA)			
	Kontrola ♂	Ekstrakt ♂	Kontrola ♀	Ekstrakt ♀
Kontrola ♂		n.z.	n.z.	n.z.
Ekstrakt ♂	n.z.		n.z.	n.z.
Kontrola ♀	n.z.	n.z.		n.z.
Ekstrakt ♀	n.z.	n.z.	n.z.	
	Repni moment			
	Kontrola ♂	Ekstrakt ♂	Kontrola ♀	Ekstrakt ♀
Kontrola ♂		n.z.	n.z.	n.z.
Ekstrakt ♂	n.z.		n.z.	n.z.
Kontrola ♀	n.z.	n.z.		n.z.
Ekstrakt ♀	n.z.	n.z.	n.z.	

Statistički značajno $p < 0,05$; n.z. – nema statističke značajnosti

3.1.2. Učinak vodenog ekstrakta listova obične planike na DNA u stanicama jetre štakora

U stanicama jetre mužjaka štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike uočena je statistički značajno ($p < 0,05$) viša vrijednost parametara dužina repa, intenzitet repa i repni moment ($18,00 \pm 0,47$; $8,81 \pm 0,58$; $1,16 \pm 0,09$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($14,79 \pm 0,32$; $4,29 \pm 0,45$; $0,37 \pm 0,04$) (Slika 16A, B, i C, Tablica 3).

Povišena, ali ne i statistički značajna vrijednost parametra dužina repa i intenzitet repa ($17,36 \pm 0,37$ i $6,85 \pm 0,53$) je uočena u stanicama jetre ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike u odnosu na kontrolnu skupinu ($16,14 \pm 0,35$ i $5,58 \pm 0,51$) (Slika 16A i B, Tablica 3). Nadalje, vrijednost parametra repni moment u stanicama jetre tretiranih ženki ($0,83 \pm 0,07$) statistički je značajno ($p < 0,05$) viša u odnosu na kontrolnu skupinu ($0,50 \pm 0,05$) (Slika 16C, Tablica 3).



Slika 16. Dužina repa (A), intenzitet repa (B) i repni moment (C) izmjereni komet testom u stanicama jetre mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

K.M. – kontrolna skupina mužjaka štakora; K.Ž. – kontrolna skupina ženki štakora; E. M. – skupina mužjaka štakora tretirana vodenim ekstraktom listova obične planike; E.Ž. – skupina ženki štakora tretirana vodenim ekstraktom listova obične planike

Tablica 3. Statističke značajnosti dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta izmjerene komet testom u stanicama jetre mužjaka i ženki štakora (analiza varijance uz post-hoc Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

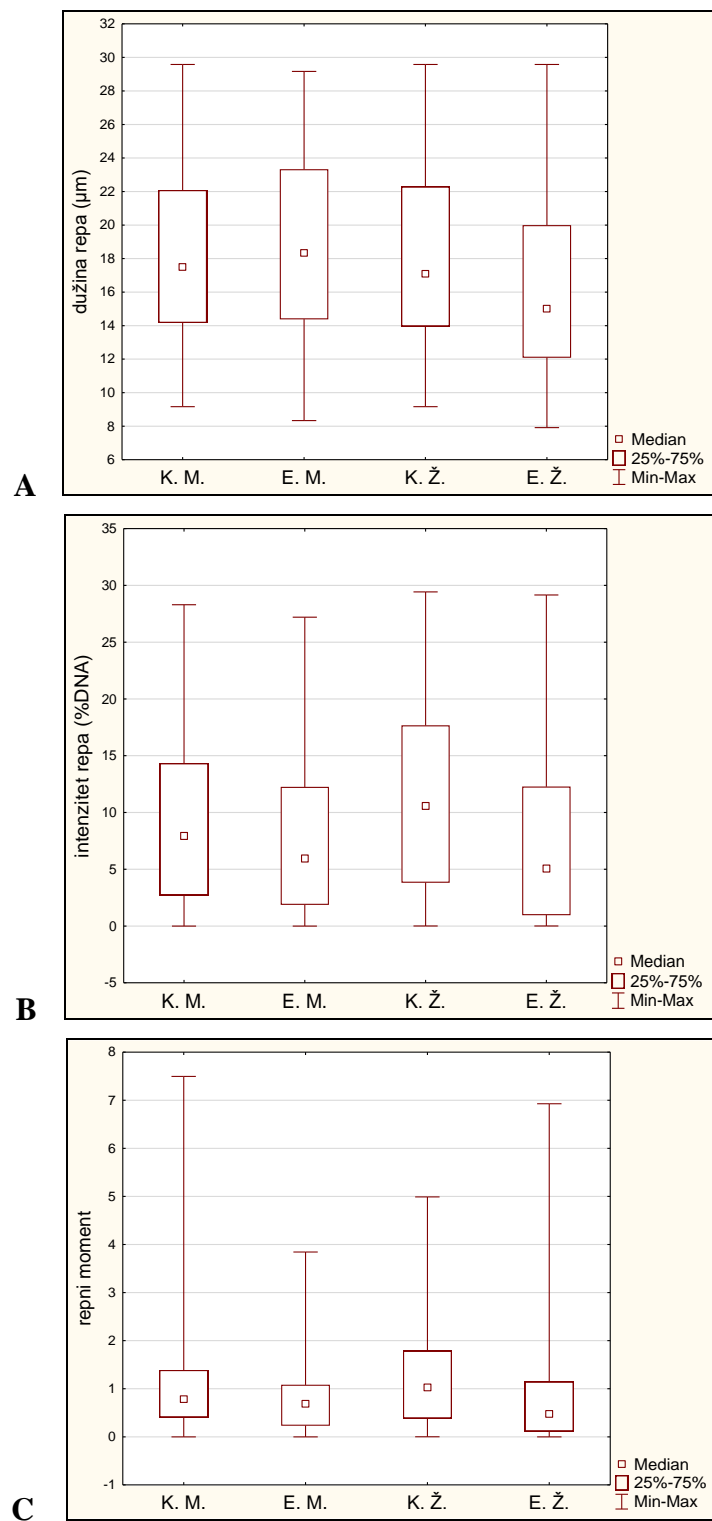
	Dužina repa			
	Kontrola ♂	Ekstrakt ♂	Kontrola ♀	Ekstrakt ♀
Kontrola ♂		0,000001	n.z.	0,000012
Ekstrakt ♂	0,000001		0,38846	n.z.
Kontrola ♀	n.z.	0,038846		n.z.
Ekstrakt ♀	0,000012	n.z.	n.z.	
	Intenzitet repa (% DNA)			
	Kontrola ♂	Ekstrakt ♂	Kontrola ♀	Ekstrakt ♀
Kontrola ♂		0,000000	n.z.	0,000402
Ekstrakt ♂	0,000000		0,000025	n.z.
Kontrola ♀	n.z.	0,000025		n.z.
Ekstrakt ♀	0,000402	n.z.	n.z.	
	Repni moment			
	Kontrola ♂	Ekstrakt ♂	Kontrola ♀	Ekstrakt ♀
Kontrola ♂		0,000000	n.z.	0,000001
Ekstrakt ♂	0,000000		0,000000	0,006474
Kontrola ♀	n.z.	0,000000		0,003963
Ekstrakt ♀	0,000001	0,006474	0,003963	

Statistički značajno $p < 0,05$; n.z. – nema statističke značajnosti

3.1.3. Učinak vodenog ekstrakta listova obične planike na DNA u stanicama mozga štakora

U stanicama mozga mužjaka štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike uočena je povećana vrijednost parametra dužina repa ($18,83 \pm 0,37$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($18,64 \pm 0,3$) (Slika 17A, Tablica 4). Snižena vrijednost uočena je u parametru intenzitet repa ($7,58 \pm 0,47$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($9,32 \pm 0,54$) (Slika 17B, Tablica 4). Vrijednost parametra repni moment statistički je značajno snižena ($0,78 \pm 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($1,07 \pm 0,08$) (Slika 17C, Tablica 4).

U stanicama mozga ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike uočena je statistički značajno niža vrijednost parametara dužina repa, intenzitet repa i repni moment ($16,35 \pm 0,39$, $7,51 \pm 0,53$ i $0,76 \pm 0,06$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($18,14 \pm 0,37$, $11,54 \pm 0,60$ i $1,19 \pm 0,07$) (Slika 17A, B i C, Tablica 4).



Slika 17. Dužina repa (A), intenzitet repa (B) i repni moment (C) izmjereni komet testom u stanicama mozga mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

K.M. – kontrolna skupina mužjaka štakora; K.Ž. – kontrolna skupina ženki štakora; E. M. – skupina mužjaka štakora tretirana vodenim ekstraktom listova obične planike; E.Ž. – skupina ženki štakora tretirana vodenim ekstraktom listova obične planike

Tablica 4. Statističke značajnosti dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta izmjerene komet testom u stanicama mozga mužjaka i ženki štakora (analiza varijance uz post-hoc Scheffé-ov test, $p < 0,05$).

	Dužina repa			
	Kontrola ♂	Ekstrakt ♂	Kontrola ♀	Ekstrakt ♀
Kontrola ♂		n.z.	n.z.	0,000031
Ekstrakt ♂	n.z.		n.z.	0,000006
Kontrola ♀	n.z.	n.z.		0,001543
Ekstrakt ♀	0,000031	0,000006	0,001543	
	Intenzitet repa (% DNA)			
	Kontrola ♂	Ekstrakt ♂	Kontrola ♀	Ekstrakt ♀
Kontrola ♂		n.z.	n.z.	0,038535
Ekstrakt ♂	n.z.		0,000352	n.z.
Kontrola ♀	n.z.	0,000362		0,000006
Ekstrakt ♀	0,038535	n.z.	0,000006	
	Repni moment			
	Kontrola ♂	Ekstrakt ♂	Kontrola ♀	Ekstrakt ♀
Kontrola ♂		0,032029	n.z.	0,001728
Ekstrakt ♂	0,032029		0,000089	n.z.
Kontrola ♀	n.z.	0,000089		0,000001
Ekstrakt ♀	0,001728	n.z.	0,000001	

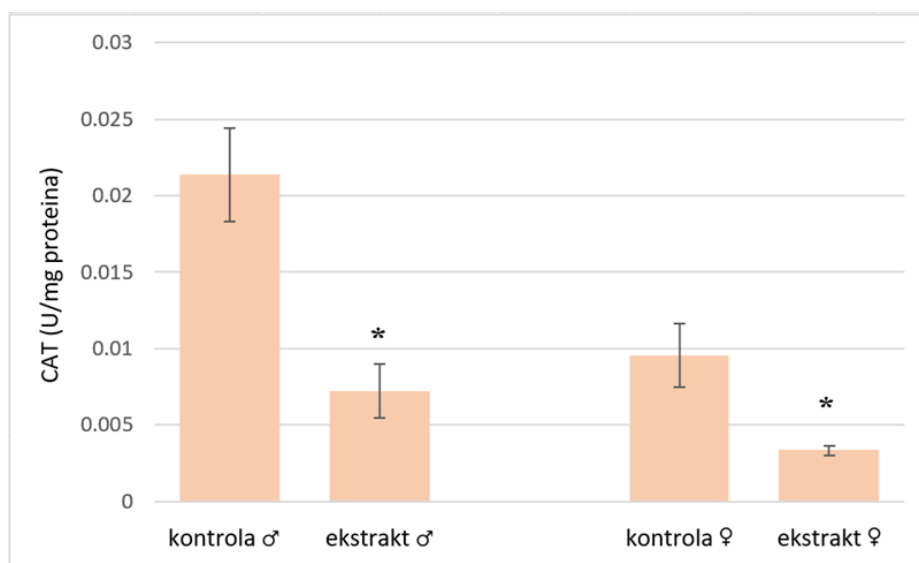
Statistički značajno $p < 0,05$; n.z. – nema statističke značajnosti

3.2. Aktivnost antioksidativnih enzima i stupanj lipidne peroksidacije

Procjena učinka vodenog ekstrakta listova obične planike (200 mg/kg) na antioksidativnu aktivnost enzima u stanicama bubrega, jetre i mozga mužjaka i ženki štakora utvrđena je mjerenjem aktivnosti enzima katalaze i superoksid dismutaze. Stupanj lipidne peroksidacije određen je mjerenjem koncentracije MDA u navedenim organima. Rezultate smo analizirali primjenom klasične deskriptivne statistike te izrazili kao srednju vrijednost sa standardnom pogreškom, a statističku značajnost smo testirali t-testom.

3.2.1. Aktivnost katalaze u stanicama bubrega štakora

U stanicama bubrega mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike aktivnost katalaze bila je statistički značajno ($p < 0,05$) niža (σ $0,007 \pm 0,002$; φ $0,003 \pm 0,000$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine (σ $0,021 \pm 0,003$; φ $0,010 \pm 0,002$) (Slika 18).

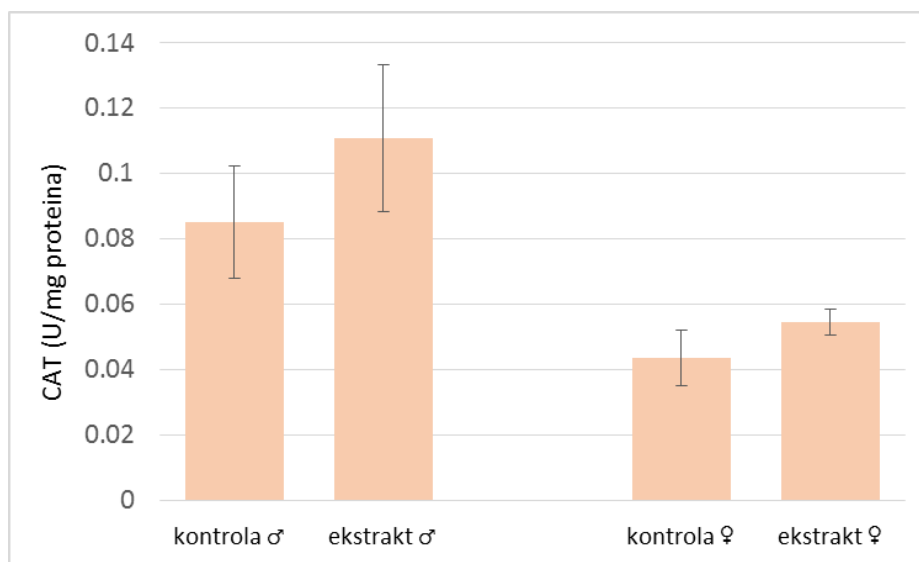


Slika 18. Aktivnost katalaze (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u stanicama bubrega mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

*statistički značajno različito u odnosu na po spolu pripadajuću kontrolnu skupinu; σ - muški spol, φ - ženski spol

3.2.2. Aktivnost katalaze u stanicama jetre štakora

U stanicama jetre mužjaka štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike aktivnost katalaze bila je slična (σ $0,110 \pm 0,022$; φ $0,055 \pm 0,004$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine (σ $0,085 \pm 0,017$; φ $0,044 \pm 0,009$) (Slika 19).

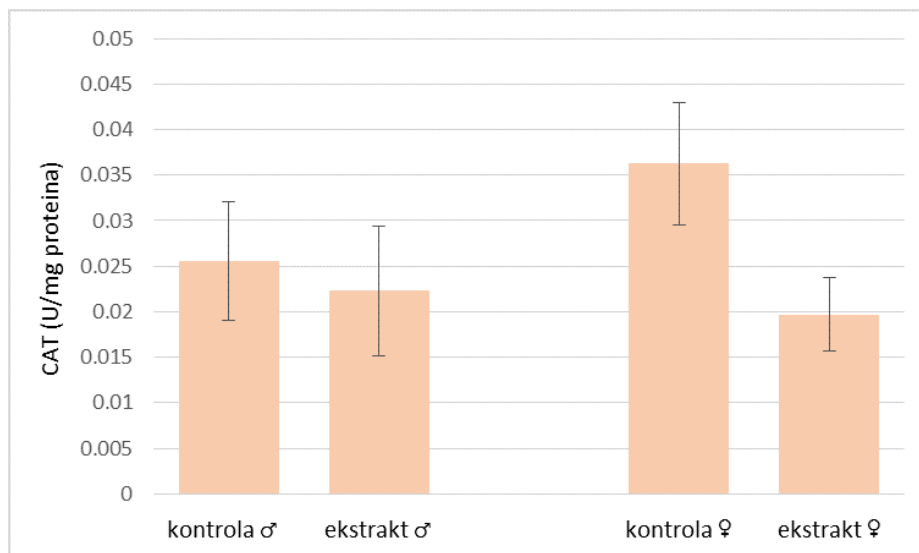


Slika 19. Aktivnost katalaze (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u stanicama jetre mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

♂ - muški spol, ♀ - ženski spol

3.2.3. Aktivnosti katalaze u stanicama mozga štakora

U stanicama mozga mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike aktivnost katalaze bila je slična (σ $0,022 \pm 0,007$; φ $0,020 \pm 0,004$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine (σ $0,026 \pm 0,007$; φ $0,036 \pm 0,007$) (Slika 20).

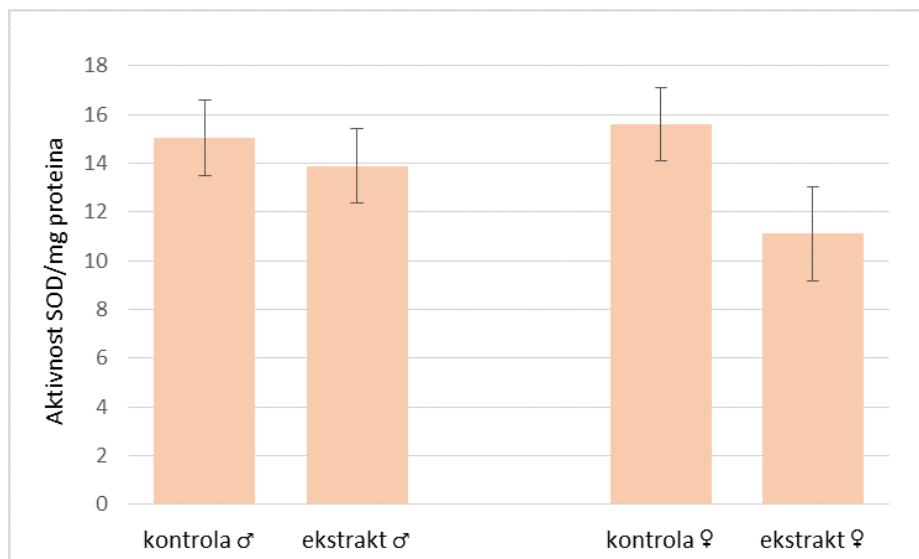


Slika 20. Aktivnost katalaze (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u stanicama mozga mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

♂ - muški spol, ♀ - ženski spol

3.2.4. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD-a) u stanicama bubrega štakora

U stanicama bubrega mužjaka štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike aktivnost SOD-a bila je slična ($13,880 \pm 1,526$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($15,025 \pm 1,552$). Aktivnost katalaze stanicama bubrega ženki štakora ($11,108 \pm 1,946$) bila je slična u odnosu na kontrolnu skupinu ($15,586 \pm 1,497$) (Slika 21).

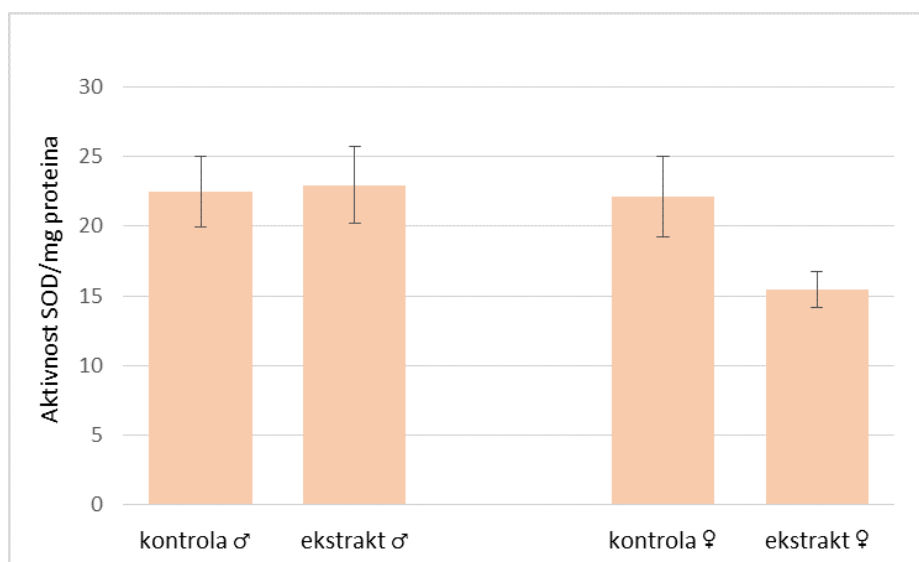


Slika 21. Aktivnost SOD-a (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u stanicama bubrega mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

♂ - muški spol, ♀ - ženski spol

3.2.5. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD-a) u stanicama jetre štakora

U stanicama jetre mužjaka štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike aktivnost SOD-a bila je slična ($22,934 \pm 2,751$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($22.456 \pm 2,549$). Aktivnost SOD-a u stanicama jetre ženki štakora bila je također slična ($15,488 \pm 1,296$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($22,113 \pm 2,892$) (Slika 22).

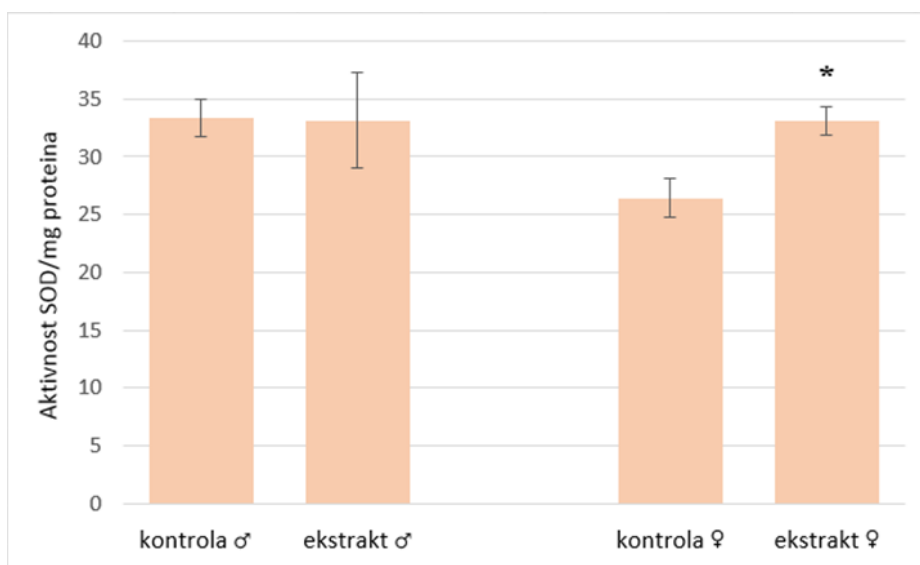


Slika 22. Aktivnost SOD-a (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u stanicama jetre mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

♂ - muški spol, ♀ - ženski spol

3.2.6. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD-a) u stanicama mozga štakora

U stanicama mozga mužjaka štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike aktivnost SOD-a bila je slična ($33,156 \pm 4,113$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($33,371 \pm 1,632$). Aktivnost SOD-a u stanicama mozga ženki štakora bila je statistički značajno ($p < 0,05$) viša ($33,137 \pm 1,230$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($26,433 \pm 1,658$) (Slika 23).

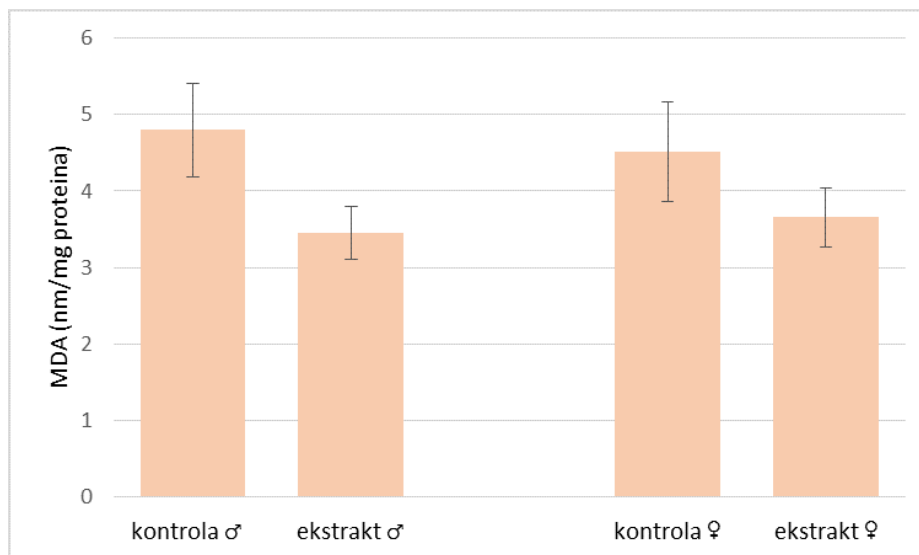


Slika 23. Aktivnost SOD-a (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u stanicama mozga mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

*statistički značajno različito u odnosu na po spolu pripadajuću kontrolnu skupinu; ♂ - muški spol, ♀ - ženski spol

3.2.7. Koncentracija malondialdehida (MDA) u stanicama bubrega štakora

U stanicama bubrega štakora oba spola tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike uočene vrijednosti između pokusne i kontrolne skupine nisu bile statistički značajne ($p < 0,05$). Koncentracija MDA bila je slična (♂ $3,451 \pm 0,349$; ♀ $3,652 \pm 0,379$) u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine (♂ $4,798 \pm 0,606$; ♀ $4,520 \pm 0,653$) (Slika 24).

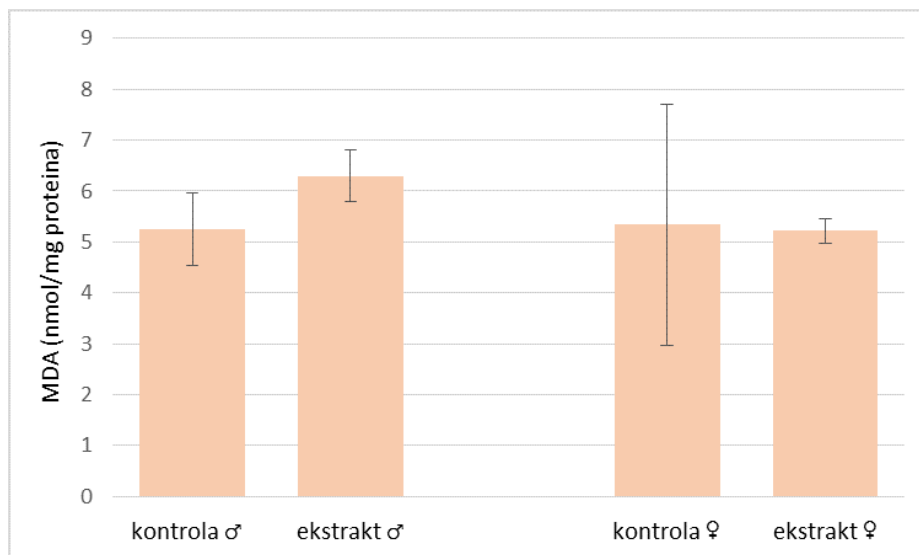


Slika 24. Koncentracija MDA (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u stanicama bubrega mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

♂ - muški spol, ♀ - ženski spol

3.2.8. Koncentracija malondialdehida (MDA) u stanicama jetre štakora

U stanicama jetre mužjaka štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike koncentracija MDA bila je slična ($6,291 \pm 0,508$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($5,256 \pm 0,708$), kao i koncentracija MDA u stanicama jetre ženki štakora ($5,215 \pm 0,232$) u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu ($5,343 \pm 2,369$) (Slika 25).

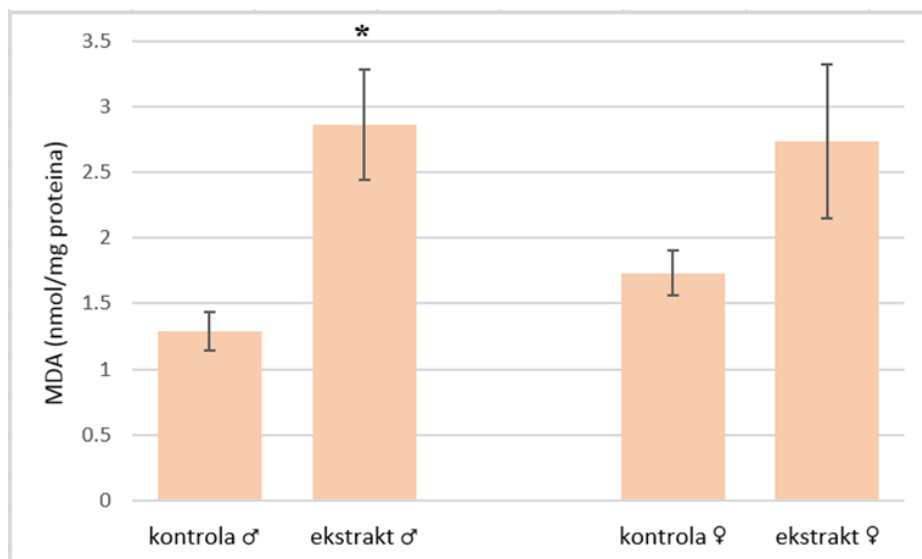


Slika 25. Koncentracija MDA (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u stanicama jetre mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

♂ - muški spol, ♀ - ženski spol

3.2.9. Koncentracija malondialdehida (MDA) u stanicama mozga štakora

U stanicama mozga mužjaka štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike koncentracija MDA bila je statistički značajno viša ($2,868 \pm 0,422$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($1,290 \pm 0,145$). Koncentracija MDA u stanicama mozga ženki štakora bila je slična ($2,739 \pm 0,590$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($1,734 \pm 0,170$) (Slika 26).



Slika 26. Koncentracija MDA (srednja vrijednost \pm standardna pogreška) u stanicama mozga mužjaka i ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike (200 mg/kg) tijekom 28 dana.

*statistički značajno različito u odnosu na po spolu pripadajuću kontrolnu skupinu; ♂ - muški spol, ♀ - ženski spol

4. RASPRAVA

Ekstrakt listova biljke *Arctostaphylos uva ursi* (*Ericaceae*) već se stoljećima koristi u fitoterapiji za liječenje urinarnih infekcija jer sadrži fenolni spoj arbutin. U biljkama, arbutin postoji slobodan ili u esterificiranom obliku (Migas i Krauze-Baranowska., 2015). Baktericidna aktivnost pripravaka koji sadrže arbutin pripisuje se hidrokinonu koji se otpušta iz arbutina. Enzim koji sudjeluje u reakciji otpuštanja hidrokinona iz arbutina unesenog u organizam je β -glukozidaza (Blaut i sur., 2006, Hildebrand i sur., 1969). Osim povoljnih svojstava, hidrokinon ima hepatotoksičan, nefrotoksičan i genotoksičan potencijal (De Arriba i sur., 2014). Zbog visoke koncentracije fenolnih spojeva u listovima obične planike o kojima je izvijestio Jurica 2016, ekstrakti listova mogu djelovati kao snažan antioksidans. Istraživanje provedeno na etanolnim i acetonskim ekstraktima listova obične planike ukazuje na visoke udjele fenolnih i flavonoidnih komponenti što dokazuje visoku antioksidativnu aktivnost ekstrakta (Andrade i sur., 2009). Istraživanja provedena u Hrvatskoj pokazuju da su vodeni ekstrakti listova obične planike jako bogati fenolnim spojevima te da se koncentracije ovih spojeva mijenjaju tijekom godine (Maleš i sur., 2006).

Ovo istraživanje provedeno je s ciljem utvrđivanja djelovanja vodenog ekstrakta listova obične planike primijenjenog u dozi od 200 mg/kg svakodnevno tijekom 28 dana. Cilj je bio proučiti utjecaj ekstrakta na DNA u stanicama jetre, bubrega i mozga štakora soja Lewis. Navedeni utjecaj analiziran je primjenom komet testa u alkalnim uvjetima, te je u istim organima promatran utjecaj ekstrakta listova obične planike na aktivnost antioksidativnih enzima (superoksid dismutaza i katalaza) i na stupanj lipidne peroksidacije (mjerenjem koncentracije malondialdehida).

Osim mnogih terapijskih svojstava neke od komponenti koji su prisutne u ekstraktima biljaka mogu uzrokovati oštećenje jetre kroz metaboličku aktivaciju visoko reaktivnih jedinki (Thapa i Walia, 2007) pogotovo kod dužeg perioda primjene. Duljina tretmana kojeg smo primijenili je 28 dana, što je dug vremenski period primjene koji je promatran kako bismo utvrdili hoće li tretman ekstraktom listova obične planike imati nepovoljan učinak. Rani znakovi oštećenja jetre na staničnoj razini mogu se detektirati komet testom u alkalnim uvjetima, dakle može se odrediti primarno oštećenje DNA u pojedinoj stanici (Hartmann i sur., 2003; Smith i sur., 2008; Tice i sur., 2000).

U stanicama bubrega mužjaka štakora izmjerene su statistički značajne niže vrijednosti parametra dužina repa u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu. S obzirom na to da parametar intenzitet repa ukazuje na slične, ali ipak blago povišene vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu, možemo reći da je do blagog oštećenja došlo, međutim DNA lomovi su se dogodili na manje mjesta u molekuli te su fragmenti ostali dugački. Ako uzmemo u obzir da hidrokinon prilikom ekskrecije dolazi u bubrege i izlučuje se mokraćom kao hidrokinon sulfat ili glukuronid (European Medicines Agency, 2012; US-FDA, 2009) te da su bubrezi vrlo osjetljivi na utjecaj hidrokinona (English i sur., 1994; Hard i sur., 1997; Peters i sur., 1997) možemo pretpostaviti da je upravo hidrokinon nastao iz arbutina koji je prisutan u primijenjenom ekstraktu listova obične planike djelovao na blago oštećenje DNA u stanicama bubrega. Tome u prilog idu i istraživanja u kojima je potvrđena nefrotoksičnost nakon 103 tjedana primjene hidrokinona u različitim dozama, međutim kada je primijenjen tijekom 65 tjedana nije primijećena nefrotoksičnost (DeCaprio, 1999). Primijećen je slabiji nepovoljni utjecaja na DNA u stanicama bubrega mužjaka. To vjerojatno ne bi bio slučaj kada bi tretman vodenim ekstraktom listova obične planike bio primijenjen u prikladnijoj dozi i kraćem vremenskom periodu. U stanicama bubrega ženki nije došlo do oštećenja DNA primjenom vodenog ekstrakta listova obične planike. Izmjereni parametri dužina repa i intenzitet repa su sniženi, a parametar repni moment povišen u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu. Iako vrijednosti nisu statistički značajne, upućuju nas na to da je moguće da je ekstrakt djelovao zaštitno na stanice bubrega ženki štakora. Promatrano zaštitno djelovanje testiranog ekstrakta može se povezati s visokom koncentracijom polifenola u ekstraktu listova obične planike. Antioksidativna efikasnost je potvrđena u prijašnjim istraživanjima (Oliveira i sur., 2009; Tavares i sur., 2010; Mendes i sur., 2011; Jurica, 2016). Mnogi drugi biljni pripravci, flavonoidi iz njih izolirani ili polifenolni sastojci sa antioksidativnim svojstvima također pokazuju nefroprotektivne utjecaje (Yanardağ i sur., 2002; Tirkey i sur., 2005; Tavafi i sur., 2012; Akomolafe i sur., 2014; Refaie i sur., 2014; Sirovina i sur., 2016). Glavni mehanizam odgovoran za zaštitnu aktivnost uključuje povećanje antioksidativnih zaštitnih sustava, utjecaj na čišćenje slobodnih radikala, sprječavanje lipidne peroksidacije i poboljšanje detoksifikacije u bubrezima. Koji mehanizam je odgovoran za protektivni utjecaj ekstrakta listova obične planike treba biti utvrđen drugim istraživanjima.

Komet testom izmjeren je nepovoljan učinak tretmana ekstraktom listova obične planike na stanice jetre mužjaka. U stanicama jetre mužjaka štakora na statistički značajne vrijednosti oštećenja DNA ukazuje parametar dužina repa. Mnoga istraživanja upućuju na to da polifenolni

spojevi mogu djelovati i prooksidativno i antioksidativno na staničnoj i DNA razini (Jovanović i Miličević, 2017; Rusak i sur., 2010). Polifenoli mogu oštetiti DNA stvaranjem reaktivnih metabolita, umetanjem u DNA, nepovoljnim djelovanjem na DNA topoizomerase i utjecajem na enzime koji održavaju integritet DNA (Noel i Rath, 2006). Možemo pretpostaviti da je došlo do narušavanja ravnoteže između oksidativnog potencijala i antioksidativnih svojstava bioaktivnih spojeva koji se nalaze u vodenom ekstraktu listova obične planike. Moguće je i da su interakcije između sastojaka, kao i njihov individualni utjecaj na stanične obrambene mehanizme mogli utjecati na razinu oksidativnog oštećenja, što se i odrazilo na razine izmjerenih oštećenja DNA.

Od svih detektiranih fenolnih spojeva, arbutin je fenolni spoj najveće koncentracije u primijenjenom ekstraktu listova obične planike (Jurica, 2016). Ako uzmemo u obzir istraživanja koja ukazuju na hepatotoksičnost hidrokinona (Blumethal i sur., 1999; McGregor, 2007) koji nastaje u jetri iz arbutina, moguće je da je upravo hidrokinon razlog oštećenja DNA u stanicama jetre. Nadalje, druga istraživanja upućuju na to da hidrokinon može dovesti do razvoja leukemije de novo, uzrokovati oštećenje DNA i kromosoma, inhibirati topoizomerasu II i mijenjati hematopoezu i klonalnu selekciju (McDonald i sur., 2001). S druge strane Williams i sur. (2007) u istraživanju učinka hidrokinona na muškim štakorima Fisher 344 (25 do 100 mg/kg dnevno) tijekom 13 tjedana nisu utvrdili znakove hepatotoksičnosti, nego čak i antikancerogeni učinak. Zanimljivo je da se razine oštećenja DNA u stanicama mužjaka štakora razlikuju između mužjaka i ženki. Vrijednosti oštećenja DNA u stanicama mužjaka štakora ukazuju na veće oštećenje DNA u mužjaka negoli u ženki. Ženski štakori imaju veće mitohondrije s većim sadržajem proteina i mnogo efikasniji kapacitet oksidacije supstrata (Justo i sur., 2005). Dakle, manje vrijednosti parametara oštećenja DNA ženskih štakora u odnosu na mužjake mogu biti posljedica utjecaja tretmana i njegovog protektivnog djelovanja, boljeg popravka, veće aktivnosti enzima i ne-enzimatskih staničnih obrambenih sustava u ženki štakora. Prijašnja istraživanja na štakorima ukazuju na razlike u oksidativnom stresu između štakora različitih spolova, potvrđeno je da je oksidativni stres veći u mužjaka (Dantas i sur., 2004). Rezultati drugog istraživanja predlažu da je tkivo mužjaka mnogo osjetljivije na utjecaje reaktivnih metabolita iz raznih lijekova kao i na reaktivne metabolite kisika. Potvrđeno je da jetra ženki ima višu aktivnost antioksidativnog enzima GSH-Px, kao i višu koncentraciju vitamina E, koji je uključen u ne-enzimatsku obranu protiv oksidativnog stresa (Julicher i sur., 1984).

Rezultati komet testa u stanicama mozga ukazuju na to da ekstrakt listova obične planike nije djelovao genotoksično. Polifenoli se metaboliziraju u jetri, prelaze u bubrege te se izlučuju mokraćom. Unatoč mnogim istraživanjima o prisutnosti flavonola (epikatehin) (El Mohsen i sur., 2002; Lin i sur., 2007; van Praag i sur., 2007), flavanona (naringenin) (Datla i sur., 2001; El Mohsen i sur., 2004; Peng i sur., 1998) flavonola (kvercetin) (Bieger i sur., 2008; de Boer i sur., 2005; Ho i sur., 2013; Ishisaka i sur., 2011) i njihovih metabolita u tkivu mozga nakon oralne primjene i dalje se raspravlja u kojoj mjeri navedeni spojevi mogu ući u mozak. Postoje pretpostavke da sposobnost prelaska krvno-moždane barijere transmembranskom difuzijom ovisi o stupnju lipofilnosti spoja (Youdim i sur., 2004). Manje polarni spojevi, kao što su metilirani derivati, imaju veću sposobnost ulaska u mozak nego polarni metaboliti kao što su sulfati i glukuronidi (Youdim i sur., 2003). Unatoč tome, druga istraživanja ukazuju na to da glukuronidi mogu ući (Bengtsson i sur., 2009; Aasmundstad i sur., 1995), međutim potrebna je točno određena doza koja bi imala određeni farmakološki učinak u tkivu mozga (Wang i sur., 2014; Wang i sur., 2012). S obzirom da su fenolni spojevi prisutni u različitom omjeru u ekstraktu listova obične planike kojeg smo primijenili te da rezultat komet testa ne ukazuje na oštećenje DNA u mozgu mužjaka i ženki štakora, možemo reći da omjer komponenti i doza iz ekstrakta najvjerojatnije nije prešla krvno-moždanu barijeru u razinama koje mogu djelovati negativno na stanice mozga. 28-dnevni tretman statistički je značajno smanjio oštećenje DNA u stanicama mozga ženki štakora, ali potrebna su daljnja istraživanja kako bi se ustvrdilo dali je pozitivan učinak posljedica indirektnog mehanizma djelovanja spojeva unesenih putem primjene ekstrakta listova obične planike ili su određeni spojevi i njihovi metaboliti prešli krvno-moždanu barijeru te direktno pozitivno djelovali na stanice mozga ženki.

U bubregu mužjaka i ženki štakora izmjerena je snižena aktivnost antioksidativnih enzima katalaze i superoksid dismutaze u odnosu na kontrolu. S obzirom na to da se razina enzima i njihova aktivnost povećava u uvjetima oksidativnog stresa, porastom reaktivnih kisikovih vrsta raste i aktivnost antioksidativnih enzima (Berg i sur., 2013). Možemo reći da je došlo do smanjenja oksidativnog stresa zbog utjecaja fenolnih komponenti za koje je poznato da djeluju antioksidativno raznim mehanizmima (Das i Pereira, 1990; Laranjinha i sur., 1995; 1995; Michalak, 2006). Tome u prilog ide i činjenica da ekstrakt nije uzrokovao lipidnu peroksidaciju u bubrezima. U stanicama mužjaka i ženki štakora izmjerena je niža razina MDA u odnosu na kontrolu. Za antioksidativnu aktivnost polifenolnih spojeva zaslužna su njihova redoks svojstva (Zheng i Wang, 2001) koja imaju važnu ulogu u adsorpciji i neutraliziranju slobodnih radikala (Laranjinha i sur., 1995), mogu donirati vodik, djelovati kao kelatori metala

(Michalak, 2006) i utjecati na razlaganje peroksida (Das i Pereira, 1990). Čišćenje slobodnih radikala je jedan od najpoznatijih mehanizama pomoću kojeg antioksidansi inhibiraju lipidnu oksidaciju (Dvorakova i sur., 2008).

U stanicama jetre mužjaka i ženki štakora zabilježene su povišene aktivnosti katalaze. Aktivnost SOD-a se razlikuje između mužjaka i ženki gdje je zabilježena viša aktivnost SOD-a u mužjaka štakora u odnosu na kontrolu, a kod ženki niža odnosu na kontrolu. S obzirom na to da su izmjerene niže vrijednost MDA i u mužjaka i u ženki štakora možemo reći da nije došlo do lipidne peroksidacije uzrokovane tretmanom vodenim ekstraktom listova obične planike.

U stanicama mozga mužjaka štakora zabilježene su snižene vrijednosti aktivnosti katalaze i SOD-a u odnosu na kontrolnu skupinu, međutim te vrijednosti nisu statistički značajne. Zanimljivo je da je kod ženki aktivnost katalaze blago sniženih vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu, a aktivnost SOD-a je statistički značajno povišena u odnosu na kontrolnu skupinu. U mozgu štakora oba spola povišene su razine MDA, kod mužjaka su te vrijednosti statistički značajne u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu. Ovakav ishod je očekivan, ako uzmemo u obzir građu mozga. Jedna od glavnih meta lipidne peroksidacije je središnji živčani sustav. Mozak je vrlo osjetljiv na oksidativni stres i oštećenja uzrokovana ROS-om. Tkivo mozga sadrži visoku koncentraciju PUFA-e koja je cilj napada ROS-a. Sadrži i visoku razinu prijelaznih metala koji pogoduju nastanku lipidne peroksidacije (Sultana i sur., 2013).

Jedna od najčešćih neželjenih nuspojava u promjeni lijekova ili ljekovitih pripravaka jest hepatotoksičnost. Iako ekstrakt ukazuje na mnoge pogodne utjecaje na zdravlje, u ovom radu tretman ekstraktom listova obične planike bio primijenjen kroz period od 28 dana te imao štetan učinak na jetru. S obzirom da vodeni ekstrakt listova obične planike sadrži mnoštvo kompleksih bioaktivnih komponenti te da njegov sastav ovisi o klimi i tlu na kojem raste obična planika, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se odredila najprikladnija doza i trajanje primjene koji će imati terapijski i zaštitni učinak, uz što manje nuspojave.

5. ZAKLJUČAK

- Vodeni ekstrakt listova obične planike (200 mg/kg) primijenjen tijekom 28 dana nije uzrokovao statistički značajne promjene vrijednosti parametara komet testa u stanicama bubrega ženki štakora. U mužjaka štakora vodeni ekstrakt listova obične planike uzrokovao je značajno sniženje vrijednosti parametra dužine repa kometa u odnosu na kontrolu.
- Primjena vodenog ekstrakta listova obične planike uzrokovala je povećanje stupnja primarnih oštećenja DNA u stanicama jetre mužjaka štakora.
- Vrijednosti sva tri parametra komet testa statistički su značajno smanjena u stanicama mozga ženki štakora tretiranih vodenim ekstraktom listova obične planike.
- Vodeni ekstrakt listova obične planike utjecao je na smanjenje aktivnosti katalaze u stanicama bubrega mužjaka i ženki štakora. Primjena vodenog ekstrakta listova obične planike nije uzrokovala lipidnu peroksidaciju u bubregu štakora oba spola.
- Vodeni ekstrakt listova obične planike nije statistički značajno utjecao na aktivnost katalaze i superoksid dismutaze u jetri štakora oba spola, kao i na stupanj lipidne peroksidacije.
- Vodeni ekstrakt listova obične planike statistički je značajno utjecao na povišenje aktivnosti superoksid dismutaze u stanicama mozga ženki štakora.
- Primjena ekstrakta listova obične planike statistički značajno utječe na intenzitet lipidne peroksidacije u mozgu mužjaka tretiranih štakora u odnosu na kontrolnu skupinu.

6. LITERATURA

- Aasmundstad TA, Morland J, Paulsen RE. Distribution of morphine 6-glucuronide and morphine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats investigated by in vivo microdialysis sampling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1995; 275(1): 435-441.
- Aebi HE. Enzymes 1: oxidoreductases, transferases. In: Bergmeyer H, Ed. *Methods of enzymatic analysis*, Deerfield Beach, FL: Verlag Chemie, 1980; 3: 273-282.
- Afkir S, Nguielefack TB, Aziz M, Zoheir J, Cuisinaud G, Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Lahlou S, Ziyyat A. *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats. Part I: Cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME induced hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008; 116: 288-295.
- Akomolafe SF, Akinyemi AJ, Anadozie SO. Phenolic Acids (Gallic and Tannic Acids) Modulate Antioxidant Status and Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats. *International scholarly research notices*, 2014.
- Alarcão-E-Silva MLCMM, Leitão AEB, Azinheira HG, Leitão MCA. The arbutus berry: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2001; 14: 27-35.
- Andrade D, Gil C, Breitenfeld L, Domingues F, Duarte A. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Industrial Crops and Products*, 2009; 30: 165-167.
- Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterranean Health Journal*, 1998; 4: 350-360.
- Bajpayee M, Kumar A, Dhawan A. The Comet Assay: A Versatile Tool for Assessing DNA Damage, 2016; 1-64.
- Barry TN, McNabb WC. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*, 1999; 81(4): 263-272.
- Bengtsson J, Ederoth P, Ley D, Hansson S, Amer-Wählin I, Hellström-Westas L, Hammarlund-Udenaes, M. The influence of age on the distribution of morphine and morphine-3-glucuronide across the blood-brain barrier in sheep. *British journal of pharmacology*, 2009; 157(6): 1085-1096.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2013): *Biokemija*, 6. izdanje. Školska knjiga, Zagreb.
- Bieger J, Cermak R, Blank R, de Boer VC, Hollman PC, Kamphues J, Wolfram S. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *The Journal of Nutrition*, 2008; 138(8): 1417-1420.
- Blaut M, Braune A, Wunderlich S, Sauer P, Schneider H, Glatt H. Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 2006; 44: 1940-1947.
- Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 1992; 18: 1-29.
- Blumenthal BM, Busse WR, Goldberg L, Gruenwald J, Hall T, Riggins CE, Riste RS. English Edition. American Botanical Council, 1999.
- Bouyahya A, El Moussaoui N, Abrini J, Bakri, Y, Dakka N. Determination of phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf extracts. *British Biotechnology Journal*, 2016; 14: 1-10.
- Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life sciences*, 2006; 78(25): 2872-2888.
- Celikel, G.; Demirsoy, L.; Demirsoy, H. The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey *Scientia Horticulturae*, 2008; 118: 115-119.

- Chisvert A, Sisternes J, Balaguer Á, Salvador A. A gas chromatography-mass spectrometric method to determine skin-whitening agents in cosmetic products. *Talanta*, 2010; 8: 530-536.
- Chopra S, Wallace HM. Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species. *Biochemical Pharmacology*, 1998; 55: 1119-1123.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 2004; 26(3): 249.
- Cook NC, Samman S. Review: flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1996; 7(2): 66-76.
- Cooper GM, Hausman RE. (2010): Stanica, 5. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.
- Cornara L, La Rocca A, Marsili S, Mariotti M. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 2009; 125: 16-30.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (2000): *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. (2006): *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing.
- Curnutte JT, Babior BM. Chronic granulomatous disease. *Advances in Human Genetics*, 1987; 16: 229-245.
- Czene S, Tiback M, Harms-Ringdahl M. pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts. *Biochemical Journal*, 1997; 323: 337-341.
- Dantas APV, Franco MDCP, Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MHC. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD (P) H-oxidase. *Cardiovascular research*, 2004; 61(1): 22-29.
- Das NP, Pereira TA. Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: Structure–activity relationship. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1990; 67: 225-258.
- Datla KP, Christidou M, Widmer WW, Rooprai HK, Dexter DT. Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport*, 2001; 12(17): 3871-3875.
- De Arriba SG, Naser B, Nolte KU. Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos uva-ursi* folium herbal preparations. *International Journal of Toxicology*, 2014; 32: 442-453.
- de Boer VC, Dihal AA, van der Woude H, Arts IC, Wolffram S, Alink GM, Hollman PC. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *The Journal of nutrition*, 2005; 135(7): 1718-1725.
- DeCaprio AP. The toxicology of hydroquinone-relevance to occupational and environmental exposure. *Critical Review in Toxicology*, 1999; 29: 283-330.
- Dewick PM. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 2nd edn. Wiley, Chichester, 2002; 112-129.
- Dib MA, Paolini J, Bendahou M, Varesi L, Allali H, Desjobert JM, Boufeldja T, Costa J. Chemical composition of fatty acid and unsaponifiable fractions of leaves, stems and roots of *Arbutus unedo* and in vitro antimicrobial activity of unsaponifiable extracts. *Natural Product Communications*, 2010; 5: 1085-1090.
- Dvorakova M, Moreira MM, Dostalek P, Skulilova Z, Guido LF, Barros AA. Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography–ultraviolet detection–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 2008; 1189: 398-405.
- El Haouari M, Mekhfi H. Anti-platelet aggregation effects of extracts from *Arbutus unedo* leaves. *Plant Science Today*, 2017; 4(2): 68-74.

- El Mohsen MA, Marks J, Kuhnle G, Rice-Evans C, Moore, K, Gibson G, Srai SK. The differential tissue distribution of the citrus flavanone naringenin following gastric instillation. *Free radical research*, 2004; 38(12): 1329-1340.
- El Mohsen MMA, Kuhnle G, Rechner AR, Schroeter H, Rose S, Jenner P, Rice-Evans CA. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002; 33(12): 1693-1702.
- El-Hilaly J, Hmammouchi M, Lyoussi B. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*, 2003; 86: 149-158.
- English JC, Perry LG, Vlaovic M, Moyer C, O'Donoghue JL. Measurement of cell proliferation in the kidneys of Fischer 344 and Sprague-Dawley rats after gavage administration of hydroquinone. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1994; 23: 397-406.
- European Medicines Agency, Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium, Herbal Medicinal Products, 2012; 44: 1-34.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 1995; 339(1): 37-59.
- Fernandez de Simon B, Perez-Ilzarbe J, Hernandez T, Gomez-Cordoves CEI. Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1992; 40: 1531-1535.
- Ferreira S, Santos J, Duarte A, Duarte AP, Queiroz JA, Domingues FC. Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Natural Product Research*, 2012; 26: 1558-1560.
- Fiorentino A, Castaldi S, D'Abrosca B, Natale A, Carfora A, Messere A, Monaco P. Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochemical Systematic and Ecology*, 2007; 35: 809-811.
- Fonseca DF, Salvador ÂC, Santos SA, Vilela C, Freire CS, Silvestre AJ, Rocha SM. Bioactive Phytochemicals from Wild *Arbutus unedo* L. Berries from Different Locations in Portugal: Quantification of Lipophilic Components. *International journal of molecular sciences*, 2015; 16(6): 14194-14209.
- Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997; 272(30): 18515-18517.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 1995; 64: 97-112.
- García-Alonso M, de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food chemistry*, 2004; 1(84): 13-18.
- Ghosh J, Myers CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998; 95: 13182-13187.
- Godinho-Ferreira PG, Azevedo AM, Rego F. Carta da tipologia florestal de Portugal Continental. *Silva Lusi*, 2005; 13: 1-34.
- Gomes F, Canhoto J. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 2009; 45: 72-82.
- Gomes F, Suares D, Santos R, Silva M, Gaspar D, Machado H. Mycorrhizal synthesis between *Lactarius deliciosus* and *Arbutus unedo* L. *Mycorrhiza*, 2016; 26: 177-188.
- Gomes MFFN. Strategies for the Improvement of *Arbutus unedo* L. (Strawberry Tree): *In vitro* Propagation, Mycorrhization and Diversity Analysis. Ph.D. Thesis, Universidade de Coimbra, Portugal, 2011.
- Guendouze-Bouchefa N, Madani K, Chibane M, Boulekbache-Makhlouf L, Hauchard D, Kiendrebeogo M, Duez P. Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities

- of three *Ericaceae* from Algeria. *Industrial crops and products*, 2015; 70: 459-466.
- Gutteridge JMC. Free radicals in disease processes. A compilation of cause and consequence. *Free Radical Research Communication*, 1993; 19: 141-158
- Guyton AC, Hall JE. (2012): *Medicinska fiziologija-udžbenik*, 12. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.
- Hagerman AE, Buttlar LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 1981; 256: 4494-4497.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999; 140-184.
- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine*, 1991; 91(3C): 14-22.
- Harborne, JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000; 55(6): 481-504.
- Hard GC, Whysner J, English JC, Zang E, Williams GM. Relationship of hydroquinone-associated rat renal tumors with spontaneous chronic progressive nephropathy. *Toxicologic Pathology*, 1997; 25: 132-143.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 2003; 18(1): 45-51.
- Hassanpour S, Sadaghian M, MaheriSis N, Eshratkhah B, ChaichiSemsari M. Effect of condensed tannin on controlling faecal protein excretion in nematode-infected sheep: in vivo study. *Journal of American Science*, 2011; 7(5): 896-900.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2002; 13(10): 572-584.
- Hildebrand DC, Powell CC Jr, Schroth SM. Fire blight resistance in *Pyrus*: localization of arbutin and betaglucosidase. *Phytopathology*, 1969; 59: 1534-1539.
- Ho L, Ferruzzi MG, Janle EM, Wang J, Gong B, Chen TY, Percival SS. Identification of brain-targeted bioactive dietary quercetin-3-O-glucuronide as a novel intervention for Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 2013; 27(2): 769-781.
- Huang MT, Ferraro T. Phenolic compounds in food and cancer prevention. In: *Phenolic compounds in food and their effects on health. II. Antioxidants and cancer prevention*. American Chemical Society, 1992; 8.
- Hurst R, Bao Y, Jemth P, Mannervik B, Williamson G. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of rat class Theta glutathione transferase T2-2. *Biochemical Society Transactions*, 1997; 25: 559.
- Ishisaka A, Ichikawa S, Sakakibara H, Piskula MK, Nakamura T, Kato Y, Terao J. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011; 51(7): 1329-1336.
- Jacob RA, Burri BJ. Oxidative damage and defense. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1996; 63: 985.
- Jornot L, Petersen H, Junod AF. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochemical Journal*, 1998; 335: 85-94.
- Jovanović IN, Miličević A. A new, simplified model for the estimation of polyphenol oxidation potentials based on the number of OH groups. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2017; 68(2): 93-98.
- Julicher RH, Sterrenberg L, Haenen GR, Bast A, Noordhoek J. Sex differences in the cellular defence system against free radicals from oxygen or drug metabolites in rat. *Archives of toxicology*, 1984; 56(2): 83-86.

- Jung UJ, Kim HJ, Lee JS, Lee MK, Kim HO, Park EJ, Choi MS. Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects. *Clinical Nutrition*, 2003; 22(6): 561-568.
- Jurica K, Karačonji IB, Šegan S, Opsenica DM, Kremer D. Quantitative analysis of arbutin and hydroquinone in strawberry tree (*Arbutus unedo* L., *Ericaceae*) leaves by gas chromatography-mass spectrometry. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2015; 66(3): 197-202.
- Jurica K, Phenolic compounds in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) and their biological effect, Doctoral thesis, Faculty of Science, University of Zagreb, Croatia, 2016; 161.
- Justo R, Boada J, Frontera M, Oliver J, Bermúdez J, Gianotti M. Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2005; 289(2): 372-378.
- Kim, T.L. *Arbutus unedo*. In *Edible Medicinal and Noin-Medicinal Plants*; Springer: Dordrecht, The Netherlands; Heidelberg, Germany; London, UK; New York, NY, USA, 2012; 2: 444-451.
- Kivçak B, Mert T, Denizci A. Antimicrobial activity of *Arbutus unedo* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001; 26: 125-128.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F. and Mol, J.N.M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 1994; 16: 123-132.
- Koshihara Y, Neichi T, Murota SI, Fujimoto AN, Tatsuno T Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984; 792: 92.
- Kumar S, Pandey AK. Phenolic content, reducing power and membrane protective activities of *Solanum xanthocarpum* root extracts. *Vegetos*, 2013; 26: 301-307.
- Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized byferrylmyoglobin: Consumption versus regeneration. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995; 323: 373-381.
- Legssyer A, Ziyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Herrenknecht C, Roumy V, Fischmeister R. Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta. *Phytotherapy research*, 2004; 18(11): 889-894.
- Leonarduzzi G, Chiarpotto E, Biasi F, Poli G. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Molecular nutrition & food research*, 2005; 49(11): 1044-1049.
- Leonti M, Casu, L, Sanna, F, Bonsignore L. A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily—De Materia Medica revisited? *Journal of Ethnopharmacology*, 2009; 121: 255-267.
- Lin LC, Wang MN, Tseng TY, Sung JS, Tsai TH. Pharmacokinetics of (-)-epigallocatechin-3-gallate in conscious and freely moving rats and its brain regional distribution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; 55(4): 1517-1524.
- Maleš Ž, Plazibat M, Bilušić Vundać V, Žuntar I. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree-*Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*).*Acta pharmaceutica*, 2006; 56(2): 245-250.
- Malheiro R, Sá O, Pereira E, Aguiar C, Baptista P, Pereira JA. *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 2012; 37: 473-478.
- Mangan JL. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition research reviews*, 1988; 1(1): 209-231.
- Mariotto S, Esposito E, Di Paola R, Ciampa A, Mazzon E, de Prati AC, Suzuki H. Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacological research*, 2008; 57(2): 110-124.

- Marnett LJ. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1999; 424(1): 83-95.
- Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers Bioscience*, 1999; 4: 339-345.
- McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative Stress. *American Journal of Medicine*, 2000; 108(8): 652-659.
- McDonald TA, Holland NT, Skibola C, Duramad P, Smith MT. Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are casual factors in leukemia. *Leukemia*, 2001; 15: 10-20.
- McGregor D. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. *Critical reviews in toxicology*, 2007; 37(10): 887-914.
- Mekhfi H, El Haouari M, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M, Atmani F, Ziyyat A. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 2004; 94(2): 317-322.
- Mendes L, de Freitas V, Baptista P, Carvalho M. Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 2011; 49: 2285-2291.
- Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2006; 15: 523-530.
- Migas P, Krauze-Baranowska M. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters*, 2015; 13: 35-40.
- Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD. *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. *Molecules*, 2014; 19(10): 15799-15823.
- Mills EM, Takeda K, Yu ZX, Ferrans V, Katagiri Y, Jiang H, Guroff G. Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1998; 273(35): 22165-22168.
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 2003; 106(1): 3-19.
- Min BR, Hart SP. Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science*, 2003; 81.14(2): 102-109.
- Molina M, Pardo-De-Santayana M, Aceituno L, Morales R, Tardío J. Fruit production of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in two Spanish forests. *Forestry*, 2011; 84(4): 419-429.
- Moore K. Isoprostanes and the liver. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2004; 128(1- 2): 125-133.
- Moualek I, Aiche GI, Guechaoui NM, Lahcene S, Houali K. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2016; 6(11): 937-944.
- Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiology Reviews*, 1985; 49: 1-32.
- Noel S, Rath SK. Randomly amplified polymorphic DNA as a tool for genotoxicity: an assessment. *Toxicology and industrial health*, 2006; 22(6): 267-275.
- Novais M, Santos I, Mendesa S, Pinto-Gomes C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 93: 183-195.
- Oliveira I, Baptista P, Bento A, Pereira JA. *Arbutus unedo* L. and its benefits on human health. *Journal of Food and Nutrition Research (Slovak Republic)*, 2011; 50: 73-85

- Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and chemical Toxicology*, 2009; 47: 1507-1511.
- Orak HH, Yagar H, Isbilir SS, Demirci AŞ, Gümüş T, Ekinci N. Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus Unedo* L.) leaf. *Food Science and Biotechnology*, 2011; 20(5): 1249-1256.
- Ostling O, Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation-induced dna damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984;123:291-298
- Pandey AK. Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and obnoxious weed *Pariheniumhisterophorus*: an in vitro study. *National Academy Science Letters*, 2007; 30(11-12): 383-386.
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Codina C. A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical analysis*, 2001; 12(5): 336-339.
- Patrignani P, Tacconelli S. Isoprostanes and other markers of peroxidation in atherosclerosis. *Biomarkers*, 2005; 10(1): 24-29.
- Pavlović, D, Lakušić B, Kitić D, Milutinović M, Kostić M, Miladinović B, Kovačević N. Antimicrobial activity of selected plant species of Genera *arbutus* l., *Calluna salisb.* and *Erica* l.(*Ericaceae*). *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 2014; 31(1): 81-85.
- Peng HW, Cheng FC, Huang YT, Chen CF, Tsai TH. Determination of naringenin and its glucuronide conjugate in rat plasma and brain tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998; 714(2): 369-374.
- Peters MM, Jones TW, Monks TJ, Lau SS. Cytotoxicity and cell-proliferation induced by the nephrocarcinogen hydroquinone and its nephrotoxic metabolite 2,3,5-(tris-glutathion-S-yl)hydroquinone. *Carcinogenesis*, 1997; 18: 2393-2401.
- Pierpoint WS. Why do plants make medicines. *Biochemist*, 2000; 22: 37–40.
- Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (2013) Narodne novine Republike Hrvatske broj 55. (Dostupno na: http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_05_55_1129.html)
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kahkonen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiology*, 2000; 56: 3-12.
- Reed JD. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 1995; 73: 1516-1528.
- Refaie AAER, Ramadan A, Mossa ATH. Oxidative damage and nephrotoxicity induced by prallethrin in rat and the protective effect of *Origanum majorana* essential oil. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 2014; 7: 506-513.
- Renugadevi J, Prabu SM. Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology*, 2009; 256(1): 128-134.
- Ribeiro MM, Piotti A, Ricardo A, Gaspar D, Costa R, Parducci L, Vendramin GG. Genetic diversity and divergence at the *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*) westernmost distribution limit. *PloS one*, 2017; 12(4): 0175239.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Broomley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plantderived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 1995; 22(4): 375-383.
- Rosavec R, Barčić D, Španjol Ž. Autochthonous woody species as an element of the Mediterranean urban area in Croatia. *Agronomski glasnik*, 2005; 67(2-4): 121-151.

- Rusak G, Piantanida I, Mašić L, Kapuralin K, Durgo K, Kopjar N. Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA interactions and DNA damaging/protecting and cytotoxic potential of flavonoids in human peripheral blood lymphocytes. *Chemico-biological interactions*, 2010; 188(1): 181-189.
- Sandalio LM, Lo'pez-Huertas E, Bueno P, Del Rí'o LA. Immunocytochemical localization of copper, zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Radical Research*, 1997; 26: 187-94.
- Scherrer R, Gerhardt P. Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *Journal of Bacteriology*, 1971; 107: 718-735.
- Schindler G, Patzak U, Brinkhaus B, von Niececk A, Wittig J, Krähmer N, Glöckl I, Veit M. Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uva ursi* extract as film-coated tablets and aqueous solution in healthy humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2002; 42: 920-7.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of dna damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 1988; 175: 184-191.
- Sirovina D, Oršolić N, Zovko Končić M, Gregorović G. Naringenin ameliorates pathological changes in liver and kidney of diabetic mice: a preliminary study, *Archives of Industrial Hygiene and Rada Toxicology*, 2016; 67: 19-24.
- Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2000; 43(5): 550-557.
- Smith CC, Adkins DJ, Martin EA, O'Donovan MR. Recommendations for design of the rat comet assay. *Mutagenesis*, 2008; 23(3): 233-240.
- Sommer J, Schroeder C, Stoeckigt J. In vivo formation of vanillin glucoside. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997; 50: 119.
- Spiteller G. The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: a new theory on atherogenesis. *The Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005; 1043: 355-366.
- Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 2007; 30: 3268-3295.
- Strack D. Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB (1997): *Plant biochemistry*. Academic, London, 387.
- Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 62: 157-169.
- Takrouni MM, Ali IBH, Messaoued C, Boussaid M. Genetic variability of Tunisian wild strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) populations interfered from isozyme markers. *Scientia Horticulturae*, 2012; 146: 92-98.
- Tavafi M, Ahmadvand H, Toolabi P. Inhibitory effect of olive leaf extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 2012; 6(1): 25.
- Tavares L, Fortalezas SC, Carrilho C, McDougall GJ, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN. Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. *Journal of Berry Research*, 2010; 1: 3-12.
- Teixeira HD, Schumacher RI, Meneghini R. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Science*, 1998; 95: 7872-7875.
- Thapa BR, Walia A. Liver function tests and their interpretation. *Indian Journal of Pediatrics*, 2007; 74(7): 663-671.

- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 2000; 35(3): 206-221.
- Tirkey N, Kaur G, Vij G, Chopra K. Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys. *BMC pharmacology*, 2005; 5(1): 15.
- Topić V, Butorac L, Jelić G. Biomass in strawberry tree coppice forests (*Arbutus unedo* L.) on Island Brač. *Šumarski list*, 2009; 133(1-2): 5-14.
- Torres JA, Valle F, Pinto C, Garcia-Fuentes A, Salazar C, Cano E. *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecology*, 2002, 160: 207-223.
- Trichopoulou A, Bamia C, Trichopoulos D. Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Archives of Internal Medicine*, 2005; 165: 929.
- Trichopoulou A, Vasilopoulou E, Hollman P, Chamalides C, Foufa E, Kaloudis T, Kromhout D, Miskaki P, Petrochilou I, Poulima E, Stafilakis K, Theophilou, D. Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 2000; 70(3): 319-323.
- Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2010; 2(12): 1231-1246.
- United States – Food and Drug Administration (US-FDA), Hydroquinone [CAS 123-31-9] Supporting Information for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program, 2009.
- Van Praag H, Lucero MJ, Yeo GW, Stecker K, Heivand N, Zhao C, Gage FH. Plant-derived flavanol (–) epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. *Journal of Neuroscience*, 2007; 27(22): 5869-5878.
- Vidrih R, Hribar J, Prgomet Ž, Poklar Ulrih, N. The physico-chemical properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 2013; 5(1): 29-33.
- Wang J, Bi W, Cheng A, Freire D, Vempati P, Zhao W, Schmeidler J. Targeting multiple pathogenic mechanisms with polyphenols for the treatment of Alzheimer's disease-experimental approach and therapeutic implications. *Frontiers in aging neuroscience*, 2014; 6.
- Wang J, Ferruzzi MG, Ho L, Blount J, Janle EM, Gong B, Sharma V. Brain-targeted proanthocyanidin metabolites for Alzheimer's disease treatment. *Journal of Neuroscience*, 2012; 32(15): 5144-5150.
- Waterborg JH. The Lowry method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, 2002; 7-9.
- Williams GM, Iatropoulos MJ, Jeffrey AM, Duan JD. Inhibition by dietary hydroquinone of acetylaminofluorene induction of initiation of rat liver carcinogenesis. *Food and chemical toxicology*, 2007; 45(9): 1620-1625.
- Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 1996; 313: 17–29.
- Wojtaszek P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, 1997; 322: 681-692.
- Yanardağ R, Bolkent Ş, Özsoy-Saçan Ö, Karabulut-Bulan Ö. The effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) extract on the kidney tissue, serum urea and creatinine levels of diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 2002; 16: 758-761.

- Yang K, Fang1 JL, Hemminki K. Abundant lipophilic DNA adducts in human tissues. *Mutation Research*, 1998; 422 (2): 285-295.
- Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C. Interaction between flavonoids and the blood–brain barrier: in vitro studies. *Journal of neurochemistry*, 2003; 85(1): 180-192.
- Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49: 5165-5170.
- Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi A, Da ssouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, 1997; 58: 45-54.

Web stranice:

https://www.naturamediterraneo.com/forum/topic.asp?TOPIC_ID=99517

Pristupljeno: 30.09.2017.

https://www.sasbdb.org/media/pdb_file/images/SASDA92_fit1_model1_img.png

Pristupljeno: 15.10.2017.

<https://cdn.rcsb.org/images/rutgers/va/1var/1var.pdb1-500.jpg>

Pristupljeno: 15.10.2017.

<http://www.janvier-labs.com/rodent-research-models-services/research-models/per-species/inbred-rats/product/lewis.html>

Pristupljeno: 27.8.2017.

7. ŽIVOTOPIS

Osobne informacije

Ime i prezime: Dora Vuković

Datum rođenja: 14.06.1992.

e-mail: dora.vukovic@outlook.com

Radno iskustvo

- ERASMUS+ stručna praksa (Institut Ludwig Boltzmann za istraživanje raka, Beč)
- Laboratorijska stručna praksa (Zavod za animalnu fiziologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta, Zagreb)
- Klinički bolnički centar Rebro (odjel za molekularnu dijagnostiku i transplantaciju)
- Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice (odjel za onkologiju)
- Studentska udruga eSTUDENT (planiranje i organiziranje znanstvenih događanja predavanja i edukativnih radionica za djecu, Zagreb)
- Promotor na društvenim događanjima (Vip d.o.o, Zagreb, Osijek)
- Agent u teleprodaji (Optima telekom d.d.)
- Sobarica (Bluesun hotels & resorts, Brela)

Obrazovanje

2015.-2017. Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno matematički fakultet

Biološki odsjek

Smjer: Diplomski studij eksperimentalne biologije

Modul: Fiziologija i imunobiologija

2011.-2015. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

2008.-2011. Opća gimnazija u Osijeku

Osobne vještine

- Dobre komunikacijske vještine stekla sam kroz rad kao agent u teleprodaji i promotor na raznim društvenim događanjima
- Dobre organizacijske i prezentacijske vještine stekla sam kroz rad u studentskoj udruzi eSTUDENT
- Vozačka dozvola B kategorije

Profesionalne vještine

- Elektroforeza, imuno elektroforeza, radioimunoesej, ELISA, ELISPOT, Protočna citometrija (FACS), Western blot, PCR, kloniranje DNA, Svjetlosna i fluorescentna mikroskopija, CRISPR/Cas9 metoda za uređivanje genoma, Uzgoj stanica u kulturi, Spektrofotometrijske metode, *In vivo* tehnike (transgenični miševi)

Strani jezici

- Materinski jezik: hrvatski
- Strani jezici: engleski, njemački

Digitalna kompetencija

Microsoft Office paket (Word, Excel, PowerPoint), Trello, obrada informacija, komunikacija (e-mail, društvene mreže), stvaranje sadržaja, sigurnost, rješavanje problema